

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**Medicina Materno Infantile e dell'Età evolutiva e  
Fisiopatologia dello Sviluppo Sessuale**

**Ciclo XXIV**

**Settore Concorsuale di afferenza: 06/G1 PEDIATRIA GENERALE, SPECIALISTICA E  
NEUROPSICHIATRIA INFANTILE**

**Settore Scientifico disciplinare: MED/38**

**“NUOVO APPROCCIO DIAGNOSTICO-TERAPEUTICO  
NELLE IPERFENILALANINEMIE CONGENITE”**

**Presentata da: Dott.ssa Ilaria Bettocchi**

**Coordinatore Dottorato**

**Prof. Luigi Bolondi**

**Relatore**

**Dott.ssa Milva Orquidea Bal**

**Esame finale anno 2012**

|  |                |
|--|----------------|
| <b><u>PARTE INTRODUTTIVA</u></b>                 | <b>pag. 3</b>  |
| LA DIAGNOSI                                      | <b>pag. 6</b>  |
| Lo screening neonatale                           |                |
| La diagnosi differenziale                        |                |
| Iter di conferma diagnostica                     |                |
| <b>CLASSIFICAZIONE DELLE IPERFENILALANINEMIE</b> | <b>pag. 11</b> |
| Iperfenilalaninemie da difetto di PAH            |                |
| Iperfenilalaninemie da difetto di BH4            |                |
| Fenilchetonuria materna                          |                |
| <b><u>PARTE SPERIMENTALE</u></b>                 | <b>pag. 24</b> |
| INTRODUZIONE                                     | <b>pag. 25</b> |
| PAZIENTI   | <b>pag. 27</b> |
| METODI   | <b>pag. 28</b> |
| RISULTATI  | <b>pag. 29</b> |
| DISCUSSIONE                                      | <b>pag. 32</b> |
| CONCLUSIONE                                      | <b>pag. 34</b> |
| <b><u>PROSPETTIVE</u></b>                        | <b>pag. 34</b> |
| <b><u>FIGURE E TABELLE</u></b>                   | <b>pag. 37</b> |
| <b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>                       | <b>pag. 49</b> |

## **PARTE INTRODUTTIVA**

La fenilchetonuria (1) è un errore congenito del metabolismo della fenilalanina (Phe), aminoacido essenziale, introdotto nel nostro organismo con le proteine della dieta e metabolizzato prevalentemente a livello epatico dal complesso enzimatico della fenilalanina idrossilasi (PAH). Tale enzima regola il catabolismo della Phe attraverso la prima fondamentale trasformazione in tirosina (Tyr) . Affinché tale enzima svolga correttamente la propria funzione di idrossilazione, necessita della presenza di un cofattore, la tetrabiopterina (BH4), di ossigeno e di ferro (*Fig.1*). L'incidenza di tale condizione varia molto in tutto il mondo (2). In Europa è di circa un individuo affetto ogni 10,000 nati vivi, praticamente sovrapponibile a quella degli Stati Uniti (1:15,000). In Turchia (3), visto l'elevato tasso di consanguineità, ed in Irlanda del nord (4), l'incidenza è notevolmente più alta (uno ogni 4000 nati vivi).

In Italia, nell'anno 2010, su 572.944 soggetti esaminati, 32 sono risultati affetti da PKU; nella regione Emilia Romagna, di cui il nostro Centro è referente, su 42.832 casi esaminati, 2 sono risultati portatore della patologia (5).

I valori normali di concentrazione di Phe nel sangue, quale risultato di un processo omeostatico di natura multifattoriale, sono compresi fra 50-120  $\mu\text{mol/L}$ .

Circa il 50% dell'aminoacido introdotto con la dieta è trasformato in Tyr mediante la PAH, mentre il 50% restante viene utilizzato per la sintesi proteica. Una piccola percentuale di Phe va incontro a transaminazione e viene trasformata in acido fenilpiruvico.

La mancanza dell'enzima PAH determina un incremento del pool plasmatico della Phe, poiché viene bloccata una delle due vie di utilizzo dello stesso.

L'altra via normale di smaltimento non può essere incrementata più di un certo livello, poiché la sintesi delle proteine dipende dalla concentrazione di numerosi aminoacidi che funzionano da fattori limitanti. Inoltre la Tyr è

presente nel liquido extracellulare in concentrazione ridotta e anche questo fattore tende a limitare una maggiore formazione di proteine. E' quindi logico che l'accumulo di substrato forzi le reazioni "alternative" in grado di smaltire l'eccesso di Phe, trasformandola in acido fenilpiruvico.

Un difetto a carico del pattern metabolico della fenilalanina determina, quindi, una condizione nota come "iperfenilalaninemia", caratterizzata da livelli di fenilalanina nel sangue superiori a 120  $\mu\text{mol/L}$ , considerato valore limite della normalità.

La fenilalanina attraversa la barriera emato-encefalica tramite un trasportatore di aminoacidi neutri (LAT1). L'accumulo della fenilalanina a livello cerebrale può compromettere lo sviluppo psicomotorio attraverso svariati meccanismi (6). Studi di neuro-imaging condotti su soggetti affetti evidenziano lesioni della sostanza bianca associate ad alterazione della mielinizzazione; tuttavia i meccanismi patogenetici non sono del tutto chiariti (7,8). Poiché altri due aminoacidi neutri (la tirosina, precursore di dopamina e norepinefrina; il triptofano precursore della serotonina) utilizzano il medesimo carrier della fenilalanina per attraversare la barriera emato-encefalica (9), è stato ipotizzato che elevati livelli di fenilalanina bloccassero l'accesso a livello encefalico dei suddetti aminoacidi, determinando una disregolazione dei relativi neurotrasmettitori e della sintesi proteica (10). Altri possibili meccanismi patogenetici ipotizzati riguardano una ridotta attività della piruvato chinasi (11), alterazioni della trasmissione glutammatergica (12), una ridotta attività dell'enzima 3-idrossi-3-metil-glutaril-coa-reduttasi (13) e della funzione della monoaminoossidasi B (14). La fenilchetonuria non trattata si manifesta con ritardo progressivo dello sviluppo psicomotorio associato ad altre numerose manifestazioni quali eruzioni cutanee, autismo, convulsioni, difetti motori, disturbi comportamentali e turbe psichiatriche.

La diagnosi precoce, il trattamento tempestivo e la buona compliance alla dieta-terapia hanno indubbiamente e drasticamente modificato la prognosi dei pazienti affetti, prevenendone il ritardo mentale. La dieta rimane il

cardine terapeutico di questa patologia; tuttavia notevoli evoluzioni sono state fatte negli ultimi anni riguardo nuove opzioni terapeutiche che possano ridurre la difficoltà e le complicanze legate ad una dieta così restrittiva per tutta la vita.

## ***DIAGNOSI***

### ***Lo screening neonatale***

Tre sono le date cardine che hanno rappresentato una svolta nella diagnosi precoce, trattamento e prognosi delle iperfenilalaninemie: nel 1934 il Dott. Asbjørn Følling (15) identificò l'iperfenilalaninemia come possibile causa di deficit neuropsichici; nel 1953 il Dott. Horst Bickel (16) dimostrò l'efficacia di una dieta a basso contenuto di fenilalanina nel trattamento della fenilchetonuria; nel 1960 il Dott. Robert Guthrie (17) ideò il primo test impiegabile come screening di massa per la diagnosi precoce delle iperfenilalaninemie (test di Guthrie).

Oggi la maggior parte degli Stati annovera i test per l'identificazione delle iperfenilalaninemie nei propri programmi di screening neonatale, lo stesso test di Guthrie o metodologie più moderne come la spettrometria di massa. Quest'ultima acquisizione ha determinato una riduzione dei risultati falsi positivi, misurando contemporaneamente il livelli di fenilalanina, tirosina ed il loro rapporto (Phe/Tyr), consentendo inoltre di identificare contemporaneamente numerosi altri markers per ulteriori errori congeniti del metabolismo (18).

I neonati dovrebbero essere sottoposti allo screening per la PKU nei primi giorni di vita, tra il secondo ed il settimo giorno di vita, tenendo conto della variabilità delle tempistiche dei vari Centri Screening in relazione ai diversi programmi di screening neonatale (19). Negli Stati Uniti il test viene effettuato mediante tandem mass tra 24 e 48 ore di vita, utilizzando come cut-off valori di Phe tra 120 e 130  $\mu\text{mol/L}$  e un rapporto Phe/Tyr  $>2$  (20); in

Italia tra 48-72 ore con gli stessi cut-off degli Stati Uniti, ma con metodologie diverse a seconda dei diversi Centri Regionali (5).

E' stato recentemente speculato che l'esecuzione troppo precoce dello screening neonatale, legato alla dimissione precoce del neonato dai Reparti Maternità, potrebbe generare l'aumento di falsi negativi in relazione alla scarsa assunzione di Phe con la dieta non sufficiente a raggiungere i cut-off. E' stato invece provato che la sensibilità dei test di screening nei neonati sani è adeguata anche prima delle 24 ore di vita, soprattutto laddove viene valutato in rapporto Phe/Tyr che accresce ulteriormente la sensibilità del test (18,21).

Si segnalano invece situazioni particolari (neonati immaturi, neonati settici, sottoposti a nutrizione parenterale o trasfusioni ematiche) che potrebbero generare false positività.

E' chiaro che, poichè il valore della fenilalanina pre-trattamento costituisce uno dei parametri utilizzati nella pratica clinica per la classificazione fenotipica delle iperfenilalaninemie, si rende necessario definire nuovi cut-off per tale classificazione.

### ***La diagnosi differenziale***

Attualmente si stima che circa il 2% delle iperfenilalaninemie identificate mediante lo screening neonatale sia legata ad un difetto del metabolismo della tetrabiopterina, imputabile ad un'alterazione della sintesi o della rigenerazione del cofattore (22, 23). I difetti legati alla BH4 sono molto più severi rispetto quelli legati a difetti della PAH; spesso il solo trattamento dieto-terapeutico non è sufficiente e diviene fondamentale l'assunzione di precursori della dopamina e serotonina, nonché la stessa tetraidrobiopterina per garantire un buon outcome.

E' essenziale, quindi, discriminare all'atto della conferma diagnostica, a che forma di iperfenilalaninemia ci troviamo di fronte.

Attualmente, disponiamo di diversi strumenti per poter effettuare una diagnosi rapida e accurata (Fig.2).

### ***Iter di conferma diagnostica***

I piccoli con iperfenilalaninemia identificati mediante screening neonatale dovrebbero essere condotti il più rapidamente possibile presso i Centri esperti di malattie del metabolismo.

Il primo approfondimento diagnostico prevede l'esecuzione di un aminoacidogramma plasmatico, che confermi un innalzamento dei livelli della fenilalanina oltre i 120  $\mu\text{mol/L}$ , valori di tirosina normali o bassi con un conseguente rapporto Phe/Tyr > di 2 e l'assoluta normalità dei livelli degli altri aminoacidi.

Confermata l'iperfenilalaninemia, è necessario verificarne l'eziologia, imputabile o meno ad un difetto del metabolismo della BH4.

Per far questo, in Europa (24), i pazienti con iperfenilalaninemia vengono sottoposti, già in epoca neonatale e prima dell'inizio della dietoterapia, a test da carico con BH4.

Questo test, abbastanza standardizzato, prevede la somministrazione orale di BH4 alla dose di 20 mg/kg. La fenilalanina è dosata prima e dopo 8, 16, 24 ore dalla somministrazione del cofattore. La normalizzazione dei livelli di fenilalanina entro 8 ore dalla somministrazione del cofattore depone per un difetto di BH4, mentre la mancata o modesta riduzione della fenilalaninemia identifica una fenilchetonuria.

Negli Stati Uniti (25), il test da carico con BH4 non viene effettuato in epoca neonatale, ma vengono dosati, su spot di sangue o sulle urine, i metaboliti della BH4 (neopterine e biopterine) e, sempre su spot di sangue, l'attività enzimatica della diidropteridina reduttasi (DHPR).

A seconda del pattern identificato nel sangue o urine, si identifica a che livello del metabolismo della BH4 si trova il difetto (*Tabella 1*).

Inizialmente tale test veniva usato solo per discriminare le iperfenilalaninemie da difetto di PAH o da difetto di BH4 (26,27);



attualmente è impiegato anche per identificare le forme di PKU responsive al trattamento con BH4 (28).

L'identificazione di questo tipo di pazienti venne descritto per la prima volta in Giappone, quindi confermato retrospettivamente e prospetticamente in coorte sempre più ampie di pazienti (29-31).

Le modalità di esecuzione del test da carico con BH4 variano molto in letteratura: prevedono la somministrazione orale di BH4 alla dose di 10 o 20 mg/kg in mono-somministrazione o a somministrazioni ripetute, associata o meno alla concomitante assunzione di fenilalanina (32-34).

In epoca neonatale, il test dovrebbe essere effettuato prima dell'inizio del trattamento dietetico e con valori di fenilalaninemia superiori a 400 µmol/L. Nei bambini o adulti già in trattamento dietetico, l'apporto di proteine naturali dovrebbe essere aumentato (tramite l'assunzione di carne o uova) prima e durante il test. La *Tabella 2* identifica i fattori che potrebbero influenzare l'esito del test da carico.

E' opinione condivisa, invece, che una riduzione della fenilalaninemia di almeno il 30% dopo carico con BH4 costituisca una risposta clinicamente significativa; tuttavia non esiste un cut-off definito per tale test e obiettivi differenti possono essere fissati per i diversi pazienti (*Fig.3*).

Anche in quest'ambito, l'approccio cambia tra Europa e Stati Uniti.

In Europa il test, inizialmente della durata di 24 ore, è stato esteso a 3 giorni (35). Il test prevede il dosaggio della fenilalanina il primo giorno; carico con BH4 alla dose di 20 mg/kg e rilevazioni della fenilalaninemia prima dell'assunzione della BH4 e dopo 8, 16, 24 ore il secondo giorno; un secondo carico con la stessa dose di BH4 e la rilevazione della fenilalaninemia agli stessi tempi il terzo giorno.

Una riduzione della fenilalaninemia maggiore dell'85%, già dopo 4-8 ore dalla somministrazione, è suggestiva di difetto di BH4, mentre un calo inferiore del 20% identifica un paziente non responsivo. Se si assiste ad una riduzione soddisfacente della fenilalaninemia (calo di almeno il 30%), il dosaggio della BH4 viene adeguato (tra 5 e 20 mg/kg) in relazione alla

riduzione dei livelli della fenilalanina. Se non si assiste ad una riduzione soddisfacente della fenilalaninemia (calo non superiore al 20-30%), si protrae la somministrazione di BH4 alla dose di 20 mg/kg per almeno 1-3 settimane, monitorizzando quotidianamente la fenilalaninemia, al termine delle quali il paziente viene identificato come responsivo (in tal caso continua la terapia) e non responsivo (sospende la terapia).

Negli Stati Uniti, la somministrazione di BH4 è quotidiana, al dosaggio di 20mg/kg, mentre il dosaggio della fenilalaninemia viene effettuato, domiciliariamente, il primo, il settimo ed il 14 giorno dopo l'inizio del carico (33). Se necessario, la somministrazione di BH4 viene protratta per altre 2 settimane ed il monitoraggio della fenilalaninemia effettuato una volta a settimana. Una riduzione della fenilalaninemia maggiore dell'85% è suggestiva di difetto di BH4, mentre un calo inferiore del 20% identifica un paziente non responsivo.

Uno studio osservazionale internazionale online (36), a cui hanno aderito 92 partecipanti provenienti da 30 differenti paesi, ha documentato che il 62% dei Centri che si occupano di malattie metaboliche utilizza il test da carico con BH4 quale parte integrante dell'iter diagnostico delle iperfenilalaninemie. La ragione principale del mancato utilizzo di tale metodica è rappresentato dall'elevato costo o dall'indisponibilità della BH4 (78%). Il 79% dei Centri utilizza questo test a tutte le età, mentre solo l'11% dei Centri applica tale test su donne affette da PKU incinta. Il dosaggio della BH4 utilizzata è di 20mg/kg nel 92% dei Centri, mentre la durata del test è molto variabile: 24ore (33%), 48 ore (24%), 72 ore (16%), tra 1e 4 settimane (16%), soprattutto negli Stati Uniti. Circa la metà dei Centri partecipanti identifica la BH4 responsività come aumento della tolleranza alla fenilalanina nella dieta e riduzione della fenilalaninemia di almeno il 30%; i restanti utilizzano come unico parametro i livelli ematici della fenilalanina.

Non ultima, riveste particolare importanza l'analisi del liquido cerebro-spinale per i difetti di BH4 che influenzano la sintesi di catecolamine,

serotonina (37) e ossido nitrico (38) nel sistema nervoso centrale. Il dosaggio di tali sostanze ed i loro metaboliti diviene fondamentale per la diagnosi differenziale delle diverse forme di difetti di BH4.

## **CLASSIFICAZIONE DELLE IPERFENILALANINEMIE**

La definizione del fenotipo clinico è essenziale per poter impostare il più corretto approccio terapeutico, per poter stabilire una prognosi e poter garantire un corretto counseling, soprattutto per future gravidanze.

In relazione al tipo di difetto alla base dell'accumulo della Phe nell'organismo, le iperfenilalaninemie possono essere divise in due gruppi :

- Iperfenilalaninemie correlate a deficit di PAH.
- Iperfenilalaninemie correlate a deficit di BH4.

### ***Le iperfenilalaninemie da difetto di PAH***

Nell'ambito del primo gruppo, nell'arco degli anni, sono state adottate numerose classificazioni. Anche la Società Italiana degli Screening Neonatali (39) scrisse un documento che potesse orientare i clinici nella diagnosi, classificazione e trattamento delle iperfenilalaninemie.

Le iperfenilalaninemie possono essere classificate in base ai livelli della fenilalanina prima dell'inizio del trattamento dieto-terapico (40):

- valori compresi tra 120 e 600  $\mu\text{mol/L}$  identificano le iperfenilalaninemie tipo mild,
- valori compresi tra 600 e 1200  $\mu\text{mol/L}$  identificano la fenilchetonuria tipo mild (talora, per valori compresi tra 900 e 1200 si identificano le forme di fenilchetonuria moderata);
- valori superiori a 1200  $\mu\text{mol/L}$  identificano la fenilchetonuria classica.

Talora questa classificazione può non riflettere esattamente il reale fenotipo del paziente, poiché, i livelli di fenilalanina pre-trattamento possono essere influenzati da vari fattori, quali il timing del prelievo, dallo stato catabolico

del neonato e dall'alimentazione ricevuta dal neonato fino al momento del prelievo. Visto l'incredibile miglioramento dei programmi di screening neonatale che prevedono l'esecuzione del prelievo al massimo in terza giornata di vita, i bambini vengono identificati estremamente precocemente rispetto il passato, prima che la fenilalanina abbia avuto il tempo di raggiungere il proprio picco. Alla luce di ciò, visto il vastissimo utilizzo di tale criterio per la classificazione (80% dei Centri intervistati), sarebbe opportuno rivedere i cut-off (36).

Le iperfenilalaninemie da difetto di PAH possono essere classificate anche in base alla tolleranza.

Questa viene determinata all'età di 5 anni e si intende come quantitativo massimo di fenilalanina assumibile con la dieta che consenta al paziente di mantenere dei livelli dell'aminoacido nel sangue entro il target terapeutico.

Possiamo identificare 3 differenti fenotipi (41):

- una tolleranza non superiore a 20 mg/kg/die identifica la fenilchetonuria classica;
- una tolleranza tra 20 e 50 mg/kg/die identifica una fenilchetonuria tipo mild o moderata
- una tolleranza superiore a 50 mg/kg/die identifica la iperfenilalaninemia tipo mild

Una classificazione più dettagliata identifica invece 4 fenotipi clinici (42,43) secondo la quale:

- una fenilchetonuria classica ha una tolleranza inferiore a 20 mg/kg/die (250-300 mg/die);
- una fenilchetonuria moderata ha una tolleranza compresa tra 20 e 25 mg/kg/die (350-400 mg/die);
- una fenilchetonuria tipo mild ha una tolleranza compresa tra 25 e 50 mg/kg/die (400-600 mg/die);
- una iperfenilalaninemia tipo mild è a dieta libera

Recentemente è stato dimostrato di poter prevedere la tolleranza di un paziente già all'età di 2 anni e che la tolleranza stimata a 2, 3, 5 anni correla

con quella a 10 anni (44). Nell'adulto, invece, la tolleranza deve assolutamente essere rivalutata (45).

Nonostante la tolleranza alla fenilalanina sia un buon indicatore per stabilire il fenotipo, la sua determinazione diviene inaffidabile se non valutata in condizioni standardizzate. La pratica clinica ci insegna che spesso la quantità di fenilalanina assunta a domicilio dal paziente supera la quota prescritta. Circa il 70% dei Centri interpellati utilizza la tolleranza alla fenilalanina come parametro per la determinazione del fenotipo (36).

Un ultimo criterio di classificazione è rappresentato dal decorso clinico, che annovera valutazioni che vanno dall'outcome (quoziente intellettuale, educazione), il valore massimo raggiunto di fenilalaninemia (per esempio durante infezioni febbrili o in virtù di una cattiva compliance alla dieta), le oscillazioni ematiche della fenilalanina ed il rapporto Phe/Tyr (46,47).

Tuttavia, nella pratica clinica il decorso clinico è utilizzato come criterio per la classificazione fenotipica solo nel 31% dei Centri clinici interpellati (36).

Le iperfenilalaninemie sono le forme che hanno maggior riscontro nella pratica clinica e sicuramente un'evoluzione più favorevole e benigna.

La loro classificazione ci consente di impostare un trattamento specifico, diversificato, in base al quale potremmo creare un'altra classificazione: pazienti che richiedono un rigoroso trattamento dieto-terapeutico (PKU); pazienti che non richiedono un trattamento dieto-terapeutico (iperfenilalaninemie non-PKU ); pazienti che possono beneficiare del trattamento con BH4 (PKU BH4 responsive).

### Clinica

Col termine di fenilchetonuria classica (PKU) si identifica una sindrome clinica, descritta per la prima volta da Fölling nel 1934 (15), caratterizzata da ritardo mentale, iperfenilalaninemia e iperfenilalaninuria, riconducibile ad un difetto, a trasmissione autosomica recessiva, della PAH.

La storia naturale della malattia è estremamente caratteristica; il cardine semeiologico è rappresentato dall'instaurarsi di un progressivo ed irreversibile deficit delle acquisizioni psico-motorie che vede la trasformazione di un bambino apparentemente sano fino a 4-6 mesi in un bambino gravemente deficitario entro il 10°-12° mese di vita (50).

Nei soggetti misconosciuti e quindi non trattati si instaura un grave ritardo mentale (quoziente intellettivo inferiore a 50) con disturbi di carattere neurologico (25% epilessia, 30% tremori, 5% spasticità, 80% alterazioni elettroencefalografiche) e comportamentale (bambini iperattivi, agitati, soggetti a crisi di rabbia difficilmente controllabili), spesso associati a microcefalia, evidente soprattutto nei soggetti più ritardati, ridotta pigmentazione degli occhi, capelli e cute, (poiché l'idrossilazione della Tyr, prima reazione nella formazione della melanina, è inibita dagli alti livelli di Phe) con manifestazioni eczematose, scarso accrescimento, odore muschiato legato all'escrezione urinaria dell'acido fenilacetico (51).

E' possibile riscontrare un certo grado di ipertonia muscolare, iperreflessia, ipercinesie diffuse e tremori.

Generalmente il fenotipo correla con i livelli di fenilalaninemia nel sangue, che riflettono l'entità del difetto enzimatico.

### Trattamento

Il cardine del trattamento nei difetti di PAH è ridurre la concentrazione ematica di Phe in modo da prevenire il danno neurologico.

Contrariamente a quanto avviene negli Stati Uniti (52), nei diversi stati europei e tra i vari Centri che si occupano di malattie metaboliche, ci sono differenze, come mostra la *Tabella 3*, riguardo il target terapeutico dei livelli ematici di fenilalanina, persino nell'ambito della prima ed importantissima prima decade di vita (24,53). Dopo i dieci anni, le differenze aumentano, sia in Europa che negli Stati Uniti (24,52,53).

Ci sono inoltre differenze relative al cut-off di fenilalaninemia oltre il quale è opportuno iniziare il trattamento dieto-terapeutico: le soglie più

comunemente usate sono: valori di fenilalanina oltre i 360  $\mu\text{mol/L}$ , oltre i 400  $\mu\text{mol/L}$  o ancora oltre i 600  $\mu\text{mol/L}$ .

Il trattamento terapeutico si basa sulla riduzione, il più precocemente possibile e mediante un approccio di tipo dietetico, degli elevati livelli di Phe nel plasma, senza che questa scenda mai al di sotto del fabbisogno minimo indispensabile per assicurare all'organismo una normale sintesi proteica. L'apporto di Phe deve quindi oscillare fra un minimo, al di sotto del quale non è possibile una crescita normale, ed un massimo che rappresenta il limite di tolleranza individuale, intesa come la quota massima di Phe compatibile col mantenimento di una fenilalaninemia entro il target terapeutico. Vanno inoltre considerati altri fattori, quali l'intensità della sintesi proteica e quindi la velocità di crescita, eventuali malattie intercorrenti, l'attività fisica, che possono incidere, nell'ambito di uno stesso soggetto, sul fabbisogno di Phe. Il rischio connesso ad un introito deficitario di Phe rispetto al fabbisogno minimo è l'insorgenza della cosiddetta sindrome da ipofenilalaninemia, caratterizzata da scarso accrescimento staturale-ponderale, ritardo psico-motorio, alterazioni ossee, maggiore suscettibilità alle infezioni, eruzioni cutanee, ipoglicemia, anemia megaloblastica, vacuolizzazione midollare, edemi disprotidemici, patologia degli annessi cutanei.

L'impostazione di un corretto regime dietetico deve tener conto:

- del livello plasmatico iniziale di Phe;
- dell'età del soggetto e quindi i suoi fabbisogni nutrizionali;
- della tolleranza individuale alla Phe.

Lo schema dietetico personalizzato prevederà: l'assunzione di miscele aminoacidiche a contenuto di Phe basso o nullo, arricchite con vitamine, oligoelementi, acidi grassi essenziali; la restrizione nell'assunzione di proteine naturali, in particolare carne, uovo, pesce, prediligendo una dieta ad impronta vegetariana; l'utilizzo di prodotti ipo/a-proteici.

Durante l'infanzia, la compliance dietetica di solito è eccellente, grazie al monitoraggio attento da parte dei genitori. Molti Centri consentono

l'allattamento al seno (24). Man mano che i bambini crescono, in particolare durante l'adolescenza, l'aderenza alla dieta diviene sempre più difficoltosa, prevalentemente in virtù del confronto con i coetanei e della crescente indipendenza rispetto la famiglia (54,55). Tra le cause principali citate quali fattori condizionanti la corretta aderenza al trattamento troviamo la ristrettezza della dieta, fattori psicosociali ed emotivi, problemi relativi il supporto da parte del nucleo familiare, l'etnia della madre, la consapevolezza della patologia, l'atteggiamento ed il rapporto con lo staff medico, la non rimborsabilità dei prodotti dietetici in alcuni sistemi socio-economici (55-57). La perdita di aderenza alla dieta, soprattutto nel paziente adulto, rappresenta attualmente un problema e pertanto una sfida nell'ambito del follow-up di pazienti con fenilchetonuria.

#### Terapie alternative/nuovi trial

Nonostante la dieta risulti essere un trattamento efficace, spesso la compliance dei pazienti diviene, col tempo, scarsa. Da qui l'esigenza di adottare strategie terapeutiche differenti maggiormente tollerate dal paziente.

- Glicomacropeptide: è una proteina che deriva dal formaggio, ricca in aminoacidi essenziali, ma priva di tirosina, fenilalanina e triptofano (58). Può essere utile in aggiunta alla dieta povera in fenilalanina e studi condotti su pazienti che la assumono, ne confermano la buona palatabilità (59,60); uno studio condotto su un gruppo di pazienti in trattamento dietetico supplementato con glicomacropeptide dimostra che 10 su 11 pazienti la preferiscono rispetto il precedente regime (61).
- Aminoacidi neutri a lunga catena: attraverso un meccanismo di tipo competitivo, determinano una riduzione del passaggio della fenilalanina a livello della barriera emato-encefalica. Assunti dopo un carico orale di fenilalanina, sembrano ridurre il picco della fenilalaninemia a livello cerebrale (9). Sebbene uno studio dimostri una riduzione della fenilalaninemia dopo assunzione per breve periodo di aminoacidi neutri



(62), non esistono numerosi dati clinici che avvalorino questa strategia terapeutica.

- Fenilalanina ammonio liasi (PAL): è un enzima che non esiste nei mammiferi, ma che ha la capacità di convertire la Phe in un composto innocuo, l'acido trans-cinnamico, e ammonio, senza necessità di cofattore (63). Nel modello murino di PKU l'inoculazione di fenilalanina ammonio liasi protratta per 90 giorni ha determinato una riduzione dei livelli di fenilalanina nel sangue e cervello (64). Un trial clinico basato sulla somministrazione sottocutanea dell'enzima pegilato è tuttora in corso, mentre un altro gruppo si sta occupando della possibilità di creare una formulazione somministrabile per via orale (65).
- Terapia genica: in letteratura ci sono diversi studi condotti su topi che, ad esempio, evidenziano il ripristino dell'attività della fenilalanina idrossilasi in topi affetti da PKU grazie all'iniezione intramuscolo di vettori per il gene PAH da solo (66) o insieme ad altri enzimi del pattern biosintetico della BH4 (67). Il trapianto di cellule epatiche (68) o terapia genica con la fenilalanina ammonio liasi costituiscono approcci alternativi.
- Trattamento con BH4: alcune mutazioni del gene PAH si associano alla BH4 responsività, ovvero grazie alla somministrazione esogena di cofattore si assiste ad una riduzione dei livelli ematici di fenilalanina (69,70). Nonostante ciò, la relazione genotipo-BH4 responsività risulta essere alquanto complessa (71)

Due formulazioni di BH4 sono state studiate per uso clinico: 6R-BH4 didroclorito e la sapropterina dicloridrato, quest'ultima di più largo utilizzo e recentemente approvata anche dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). Si somministra per via orale alla minima dose efficace, con un massimo di 20 mg/kg/die. Da studi clinici è emerso che i più frequenti effetti collaterali segnalati risultano essere cefalea (20%), faringodinia (15%), rino-faringite (14%), vomito (13%), diarrea (10%)

(72,73). Sono noti solo gli effetti del farmaco sul metabolismo della fenilalanina, ovvero la riduzione della concentrazione ematica della fenilalanina o l'aumento dell'apporto dell'aminoacido con la dieta a parità di livelli ematici dello stesso. Dati relativi l'outcome neuro-cognitivo di questi pazienti sono scarsi (74).

### Prognosi

Molti fattori quali l'età di inizio del trattamento, la fenilalaninemia nei diversi periodi della vita, la durata del periodo di difetto di Phe, il gradiente di permeabilità individuale della barriera emato-encefalica alla Phe, incidono sull'outcome del paziente fenilchetonurico. Tuttavia, il parametro in assoluto più importante è costituito dai valori di Phe nel sangue durante l'infanzia. Studi longitudinali condotti sullo sviluppo psicomotorio di questi pazienti ha evidenziato che l'inizio del trattamento dietetico entro le prime 3 settimane di vita con valori medi di fenilalaninemia uguale o inferiore a  $400\mu\text{mol/l}$  durante l'infanzia si associano ad uno sviluppo intellettuale pressoché normale, e che ogni aumento della fenilalaninemia pari a  $300\mu\text{mol/l}$  nel corso dei primi 6 anni di vita determina una riduzione del QI di 0.5 DS, così come tra i 5 e 10 anni di vita un calo pari a 0.25 DS. In aggiunta, è dimostrata una riduzione del QI di 0.25 DS per ogni 4 settimane di ritardo sull'inizio del trattamento dieto-terapeutico e per ogni 5 mesi di insufficiente apporto di Phe. Dopo i 10 anni di vita, tutti gli studi condotti evidenziano un QI stabile ed una normale carriera scolastica fino all'adolescenza, a patto di una gestione dietetica conforme alle indicazioni (75-78). Attualmente esistono pochi studi che riguardino la tarda adolescenza e l'età adulta.

### Complicanze neurologiche

Studi neuropsicologici condotti sui tempi di reazione dimostrano una maggior vulnerabilità, persistente durante la vita ma reversibile, del cervello dei soggetti affetti da iperfenilalaninemia (79).

Praticamente tutti i pazienti, se sottoposti a lungo ad elevati valori di Phe, mostrano alla RMN anomalie della sostanza bianca che, però, sembrano non correlare con deficit psicologici o neurologici (80).

Soggetti con ottima compliance possono incorrere in sintomi depressivi o scarsa autostima, verosimilmente correlati alla cronicità della malattia.

Un numero molto ristretto di adolescenti e giovani adulti può incorrere in vere e proprie patologie neurologiche che generalmente regrediscono con il ripristino della dieta. Questi soggetti generalmente avevano già, durante l'infanzia, un cattivo controllo della malattia.

Il rischio di sviluppare problematiche neurologiche in epoca adulta nei soggetti con un buon controllo durante l'infanzia è veramente minimo.

E' più frequente che ciò si verifichi in relazione a severi difetti di vitamina B<sub>12</sub>.

#### Complicanze da deficit nutrizionali

Nonostante gli ottimi risultati raggiunti nella realizzazione delle miscele aminoacidiche arricchite di vitamine, oligoelementi, acidi grassi essenziali, l'eventualità di incorrere in deficit di tipo nutrizionale è sicuramente più probabile in bambini affetti da PKU rispetto la popolazione normale, sia per le rigorose restrizioni dietetiche cui devono sottostare, sia per i problemi di compliance ad un programma alimentare ben preciso.

Uno studio condotto su 99 adolescenti e giovani adulti tedeschi affetti da PKU (81) ha evidenziato la tendenza, dopo i 10 anni, a seguire una dieta meno rigida per quel che riguarda l'introduzione di Phe, autolimitando l'apporto di proteine di origine animale e fibre e sospendendo o limitando l'assunzione delle miscele aminoacidiche.

I principali deficit nutrizionali riguardano le vitamine del complesso B, in particolare la vitamina B<sub>12</sub> (presente solo nelle proteine di origine animale), più volte riportato in letteratura in pazienti PKU adolescenti e adulti (82-84).

Altri autori riportano una riduzione del contenuto minerale osseo in bambini, adolescenti, adulti, in trattamento dietetico affetti da PKU (85,86);

un deficit di ferro, con bassi livelli di ferritina e valori di emoglobina e MCV peraltro nella norma. Non è ben spiegato il motivo della bassa biodisponibilità del ferro nelle diete dei fenilchetonurici, poiché l'apporto di vitamina C, che favorisce l'assorbimento del ferro, è solitamente alto. E' probabile che l'interazione con i sali di calcio e fosforo, la grande quantità di acidi grassi polinsaturi e fibre presente in una dieta ricca di vegetali e lipidi di origine vegetale ostacolano il suo assorbimento (87).

Altri autori descrivono ridotti livelli di zinco nonostante un adeguato apporto alimentare, che potrebbe determinare un ridotto accrescimento e minor resistenza alle infezioni. Il meccanismo postulato alla base di tale carenza sarebbe da imputarsi ad un alterato assorbimento in parte dovuto ad elevati apporti di acidi grassi polinsaturi, fibre e caseina, ed in parte ad un meccanismo di tipo competitivo tra ferro, calcio, fosforo e zinco, per cui alti apporti di fosforo aumentano le perdite di zinco con le feci (88).

Acosta et al. nel 1996 hanno riscontrato nei bambini affetti da PKU basse concentrazioni plasmatiche di retinolo, non giustificate da basso apporto di vitamina A (89). Tale carenza può determinare un'anemia resistente alla somministrazione del ferro.

Risulta spesso deficitario, in relazione anche alla sua frequente assenza nelle miscele dietetiche per PKU, il selenio. In uno studio tedesco (90) si è notato un aumento della tiroxina plasmatica (T4), con valori peraltro normali di T3 e TSH, giustificato probabilmente dal fatto che l'enzima che converte T4 in T3 è selenio dipendente. Un supplemento di selenio in questi pazienti ha normalizzato i valori ematici di selenio, ha ridotto la tiroxina totale e fT3, aumentando la tiroxina libera (fT4). In aggiunta si è avuta una riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo e LDL. Altri autori sottolineano che i pazienti PKU presentano un sistema ossidante meno efficiente rispetto ai controlli (il selenio è cofattore dell'enzima anti-ossidante glutatione perossidasi), suggerendo che una supplementazione di selenio sarebbe auspicabile nei soggetti con una dieta povera di proteine naturali (91).

Infine, ma non ultima per importanza, autori descrivono la carenza di lipidi. Poiché gli alimenti di origine animale sono praticamente assenti nella dieta dei PKU, l'apporto lipidico è garantito principalmente dagli oli vegetali che hanno un alto contenuto di acidi grassi insaturi con basso colesterolo (92). Spesso non vi sono acidi grassi polinsaturi a lunga catena della serie n-3, eicosapentenoico (EPA), docosaesanoico (DHA) e basse quantità di acido arachidonico (AA), costituenti fondamentali di tutte le membrane cellulari ed hanno un ruolo di primaria importanza nello sviluppo e nella funzione del SNC e della retina. L'acido arachidonico è un precursore di molti mediatori coinvolti in funzioni biologiche, inoltre è considerato come semi-essenziale per la crescita somatica. Agostoni et al. hanno evidenziato un miglioramento nella funzione visiva di bambini PKU, la cui dieta è stata opportunamente supplementata di AA, EPA e DHA (92,93).

#### ***Le iperfenilalaninemie da difetto di tetrabiopterina***

I disordini legati alla BH4, trasmessi con modalità autosomico-recessiva, associati ad iperfenilalaninemia e difetto di amine biogeniche, includono: difetto GTP-CH, difetto 6-PTS, difetto DHPR, difetto di PCD.

La distonia dopamina-responsiva (DRD), legata ad una forma dominante di difetto di GTP-CH, e il difetto di sepiapterina redattasi (SR), determinano una carenza di amine a livello del sistema nervoso centrale, ma si associano a livelli normali di Phe nel sangue.

#### **Clinica**

La clinica è piuttosto variabile: si va da un paziente totalmente asintomatico, identificato attraverso lo screening neonatale per il riscontro di iperfenilalaninemia ad un paziente sintomatico con progressivo deterioramento neurologico durante l'infanzia nonostante il trattamento dieto-terapeutico oppure a dieta libera per la non concomitanza di iperfenilalaninemia.

Un'alterazione nell'omeostasi della BH4 gioca un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'encefalopatia metabolica, poiché la tetraidrobiopterina è cofattore nell'idrossilazione di Phe, Tyr e Triptofano (Trp) e dell'ossido nitrico sintetasi.

L'alterazione di questi processi determina un'inibizione della sintesi di importanti neurotrasmettitori quali la dopamina, la noradrenalina, la serotonina.

Si assiste pertanto a comparsa nel primo trimestre di vita di disturbi del tono e della deglutizione, discinesie bucco-facciali, seguiti da convulsioni di tipo mioclonico con progressivo e grave deterioramento psicomotorio nel secondo semestre di vita, fino ad ipotonia assiale ed evoluzione verso lo stadio di vita vegetativa.

### Trattamento

La terapia è spesso combinata e si può avvalere, a seconda dei difetti specifici, sia del controllo della fenilalaninemia mediante un trattamento dietetico simile alla fenilchetonuria, sia della correzione del difetto di amine a livello del sistema nervoso centrale mediante la somministrazione orale di BH4, L-Dopa associata a carbidopa, 5-OH-triptofano, acido folico.

Di recente introduzione nel trattamento farmacologico sono la selegilina e l'entacapone che possono ridurre la dose di L-dopa e 5-OH-triptofano, determinando un miglioramento della clinica.

### Prognosi

In assenza di trattamento i pazienti con difetto di GTPCH, PTPS, DHPR vanno incontro ad un progressivo deterioramento neurologico che li conduce ad una morte precoce. La prognosi dei pazienti trattati dipende dall'età della diagnosi e dalla severità del fenotipo. La maggior parte dei bambini con difetto di GTPCH e PTPS hanno vari gradi di difficoltà di apprendimento nonostante un trattamento soddisfacente. I pazienti con

difetto di DHPR se in corretto trattamento a partire dal primo mese di vita, mostrano uno sviluppo e crescita assolutamente normali.

### ***Fenilchetonuria materna***

La placenta non protegge il nascituro, seppur sano, dall'iperfenilalaninemia materna, che è responsabile di gravi danni al feto, specie nel periodo dell'organogenesi. Il rischio è tanto più elevato quanto più alti sono i livelli plasmatici di Phe della madre.

L'unica possibilità di prevenzione dell'embriofetopatia è la dieta-terapia materna iniziata prima del concepimento (94-96), equilibrata in base alla tolleranza individuale alla Phe. E' necessario che venga applicato un rigido controllo metabolico, con mantenimento di valori di fenilalaninemia compresi tra 120 e 360  $\mu\text{mol/l}$  nel Nord America, 100 e 250  $\mu\text{mol/l}$  in Gran Bretagna e rigida osservazione della dieta, in modo da garantire un adeguato apporto di tutti i nutrienti.

## **PARTE SPERIMENTALE**



## **INTRODUZIONE**

La fenilchetonuria è una malattia a trasmissione autosomica recessiva, legata a mutazioni del gene fenilalanina idrossilasi (PAH; EC 1.14.16.1), collocato sul braccio lungo del cromosoma 12.

Come già postulato, la quantificazione dell'attività enzimatica residua della fenilalanina idrossilasi può avere implicazioni fondamentali nell'approccio terapeutico, sia per quello che riguarda la tolleranza alla fenilalanina che la BH4 responsività.

Lo studio molecolare di questi pazienti, però, non fa ancora parte dell'iter di conferma diagnostica.

Il gene PAH venne clonato nel 1983 (97) e praticamente da allora si cominciarono a studiare le mutazioni a suo carico. Dal 1996 la McGill University (98) creò il “Phenylalanine Hydroxylase Locus Knowledgebase” (PAHdb) con l'intento di raccogliere quante più informazioni possibili sulle mutazioni a carico del gene PAH identificate da laboratori e clinici sparsi in tutto il mondo (<http://www.pahdb.mcgill.ca/>). Ad oggi questo database raccoglie informazioni su 564 mutazioni a carico del gene PAH, per 200 delle quali è nota anche l'attività enzimatica residua.

Di queste 564 mutazioni, il 60.5% sono missenso, 13.5% sono delezioni, 11% mutazioni a carico del sito di splicing (5.7% mutazioni silenti), 5% mutazioni non senso ed infine l'1,8% inserzioni.

Divenne presto evidente che la maggior parte dei pazienti era eterozigote composto, ovvero portatore di diverse mutazioni in ciascuno dei propri alleli, per cui il fenotipo clinico dipendeva dall'effetto ed interazione di entrambe.

La prima pubblicazione condotta su un esteso campione di pazienti PKU è riuscita a stabilire una correlazione tra genotipo e fenotipo biochimico (99).

Il campione pazienti PKU è stato testato per 8 mutazioni del gene PAH per le quali era nota l'attività enzimatica residua testata in vitro; ciò ha consentito di selezionare un campione di 104 pazienti. Gli autori hanno determinato una stretta correlazione tra fenotipo e genotipo, nonostante

quest'ultimo fosse definito in base ad un'attività enzimatica residua supposta, calcolata come media dell'attività enzimatica residua relativa per entrambe gli alleli, probabilmente una semplificazione rispetto la reale situazione in vivo. Lo scopo dello studio era poter reputare così affidabile il genotipo in termini di predittività fenotipica da poter eliminare i test attualmente considerati gold-standard per la classificazione delle iperfenilalaninemie.

Un altro grosso studio multicentrico condotto nel 1998 (42) ha portato alla conclusione che sicuramente il genotipo costituisce il principale fattore determinante il fenotipo, tuttavia numerosi altri studi demoliscono questa consapevolezza, attestando, ad esempio, che lo stesso genotipo può essere associato a diversi fenotipi.

Molti autori, il primo fu Kaufman (100) ha sottolineato che l'attività enzimatica residua si determina per la combinazione delle singole attività residue legate alle mutazioni presenti su entrambe gli alleli, ma non mediante una semplice media matematica dell'attività determinata in vitro.

Anche la relazione tra genotipo e BH4 responsività è estremamente complessa. I meccanismi legati alla responsività alla BH4 sono multifattoriali (101), ma il principale sembra essere legato alla stabilizzazione della struttura tetramerica dell'enzima, prevenendone lo svolgimento, l'aggregazione delle subunità, la degradazione proteolitica e l'inattivazione legata alla temperatura (102-103)

Oltre a quello della McGill University, esiste un altro database creato dalla Università di Zurigo, il BIOPKU ([www.biopku.org](http://www.biopku.org)), nel quale sono catalogati i completi genotipi di 730 pazienti affetti da fenilchetonuria, i loro rispettivi fenotipi (basati sui massimi livelli della fenilalaninemia mai raggiunti prima dell'inizio del trattamento dieto-terapeutico) e la loro responsività al trattamento con BH4. Questi pazienti costituiscono un totale di 430 differenti combinazioni tra diverse mutazioni.

Da questo database sono emerse, come confermato poi dalla letteratura, combinazioni di mutazioni per le quali non esiste stretta correlazione col

fenotipo. Ad esempio, la mutazione R261Q in omozigosi o in combinazione con la R158Q, la L48S in omozigosi o in combinazione con la R158Q, la Y414C in combinazione con la R408W. Nonostante ciò, tutte queste combinazioni, eccetto una piccola percentuale della L48S in omozigosi, si associano a BH4 responsività. La stessa osservazione è stata fatta in uno studio condotto su pazienti turchi (104) nei quali la mutazione lieve E390G in omozigosi nel 40% dei soggetti non si associava a BH4 responsività; nei rimanenti in omozigosi e nei pazienti in cui tale mutazione era presente in eterozigosi invece si osservava responsività a trattamento con cofattore.

Le considerazioni che è possibile trarre dal BIOPKU (105) sono le seguenti: le combinazioni di mutazioni che determinano in vitro un'attività residua inferiore al 15% causano fenilchetonuria classica e non rispondono alla supplementazione con BH4, mentre le mutazioni che determinano un'attività residua maggiore del 20% rispondono alla BH4 ed il fenotipo di tali pazienti è tra mild e moderato; le mutazioni nel sito di splicing possono causare fenilchetonuria classica o mild a seconda del “trascritto” (a volte, nonostante la mutazione, il trascritto è normale); l'associazione tra mutazioni lievi e mutazioni classiche che determinano la stessa attività enzimatica residua può produrre diversi fenotipi; per alcune mutazioni la responsività alla BH4 è ormai accreditata, tanto da rendere superflua l'esecuzione di test da carico con BH4.

L'intento di questo studio è effettuare l'analisi molecolare del gene PAH, evidenziare possibili correlazioni tra genotipo e fenotipo e fare una previsione della BH4 responsività in un gruppo di pazienti affetti da iperfenilalaninemia in follow-up presso il nostro Centro.

## ***PAZIENTI***

Lo studio è stato condotto su 48 pazienti in regolare follow-up presso il nostro Centro. Di questi soggetti, la maggior parte (n°46) è stata identificata mediante Screening Neonatale che in Emilia Romagna si effettua dal 1980 (il corrente valore soglia per il richiamo è 120  $\mu$ mol/L).

Nell'ambito della popolazione studiata, 3 pazienti (2 nati precedentemente l'introduzione dello screening neonatale e 1 nato in un'altra Nazione, dove lo screening neonatale per le iperfenilalaninemie non viene effettuato), sono giunti alla nostra osservazione, nel primo caso, per severo ritardo mentale, nel secondo grazie all'identificazione dell'iperfenilalaninemia del fratello minore, nato in Italia.

La diagnosi è stata confermata dopo aver escluso difetti del metabolismo della tetraidrobiopterina mediante dosaggio delle pterine, sieriche o urinarie, e dell'attività della diidropteridina reduttasi (DHPR) su eritrociti.

I pazienti sono stati suddivisi fenotipicamente in base ai livelli di fenilalanina ematici pre-trattamento dieto-terapeutico (106).

Abbiamo classificato quindi i pazienti in affetti da PKU classica, con valori di Phe pre-trattamento superiori a 1200  $\mu\text{mol/L}$ ; pazienti affetti da PKU mild, con valori di Phe pre-trattamento tra 1200 e 600  $\mu\text{mol/L}$ ; pazienti affetti da iperfenilalaninemia mild (con valori compresi tra 600 e 360  $\mu\text{mol/L}$ ); pazienti affetti da iperfenilalaninemia (con valori di fenilalanina compresi tra 360 e 600  $\mu\text{mol/L}$ ), non soggetti a trattamento dieto-terapeutico. L'esigenza di creare quest'ultima categoria nasce dall'adozione, da parte dei Centri italiani che si occupano di Malattie Metaboliche, del valore soglia di 360  $\mu\text{mol/L}$  per l'inizio del trattamento dieto-terapeutico, scelta non globalmente condivisa da altri Centri Europei che hanno soglie diverse (400 o 600  $\mu\text{mol/L}$ ).

Lo studio, effettuato su probandi ed entrambe i genitori, è stato condotto previa raccolta di consenso informato firmato dai pazienti o dai genitori per l'esecuzione dello studio molecolare.

## ***METODI***

Il DNA è stato estratto da campioni di sangue periferico. I 13 esoni e relative regioni fiancheggianti contenenti i siti di splicing del gene PAH sono stati amplificati mediante PCR e successivamente sottoposti a sequenziamento automatico (Beckman CEQ 8000).

I dati relativi la quantificazione dell'attività enzimatica residua sono stati estrapolati dal Phenylalanine Hydroxylase database (PAHdb) della McGill University. L'attività enzimatica residua è definita come la media delle attività enzimatiche residue dei due alleli mutati di ciascun individuo ed espressa come percentuale rispetto quella della proteina wild-type.

## ***RISULTATI***

L'analisi molecolare condotta su 48 pazienti (di cui 3 coppie di fratelli) afferenti al nostro Centro ci ha permesso di descrivere 87 alleli, mentre 3 rimangono non caratterizzati: in due si sospetta la presenza di una delezione e l'analisi è attualmente in corso; nel terzo è stata identificata una nuova mutazione, mai descritta, silente (L287L), per cui non possiamo escludere un' alterazione nella regolazione dello splicing che richiede, pertanto, uno studio funzionale.

Abbiamo identificato 35 diverse mutazioni puntiformi distribuite lungo il gene PAH: 21 mutazioni missenso (60%), 8 mutazioni di splicing (22.8%), 4 mutazioni nonsense (11.4%), 2 mutazioni di frameshift (5.7%).

Alcune mutazioni sono risultate ricorrenti: IVS10-11 G>A (19.3%), lesione già precedentemente descritta come molto frequente nella popolazione toscana, siciliana, pugliese e lucana, R261Q (9.1%), R158Q (9.1%), R408Q (6.8%) e A403V (5.7%).

La maggior parte delle mutazioni, come prevedibile, si trova sul dominio catalitico (19), alcune nel dominio regolatorio (7), altre nel dominio di tetramerizzazione (1). Abbiamo inoltre identificato 8 diverse mutazioni introniche.

L'analisi molecolare ha raggiunto una detection rate del 98%: 46 pazienti sono stati completamente genotipizzati; nei 2 rimanenti è stata individuata una sola mutazione causativa.

Tra i pazienti genotipizzati, solo 5 sono risultati omozigoti. Il dato è stato confermato grazie all'analisi molecolare condotta su entrambe i genitori per 4 di questi; nell'ultimo paziente la presenza di un solo genitore portatore ci

fa ritenere estremamente probabile la presenza di una delezione sull'altro allele. Tuttavia, in attesa che tale studio venga ultimato, non possiamo escludere l'omozigosi. I rimanenti sono eterozigoti composti.

Tra i pazienti completamente genotipizzati possiamo osservare 42 differenti combinazioni genotipiche, tra le quali 3 (F55fsX/R261Q, R408Q/R158Q, IVS10-11 G>A/ A403V) ricorrono in 2 pazienti ciascuno.

Abbiamo identificato due nuove mutazioni, mai descritte in letteratura.

La mutazione N223Y coinvolge un residuo perfettamente conservato del dominio catalitico nel loop tra le alfa eliche n° 4 e 5. Il grado di conservazione, nonché la localizzazione, suggeriscono una implicazione nel fenotipo osservato, ma sono naturalmente necessari studi funzionali per valutare il grado di riduzione dell'attività enzimatica.

La sostituzione C>G al codone n°287 (CTG) che causa una mutazione silente (L287L), non comporta un cambio aminoacidico ed è quindi potenzialmente ininfluenza. Tuttavia il fenotipo della paziente e l'assenza in banca dati degli SNPs (NCBI) ci fa ritenere una possibile sua implicazione nel fenotipo. L'ipotesi, la cui verifica richiede studi funzionali, è quella dell'alterazione del meccanismo dello splicing dell'esone 8.

### *Correlazioni genotipo-fenotipo*

In accordo con i principi di classificazione fenotipica illustrati nella parte dei metodi, abbiamo suddiviso i nostri 48 pazienti nel modo seguente (*Tabella 4*): 17 pazienti affetti da PKU classica (35,4%), 10 pazienti affetti da PKU mild (20,8%), 11 pazienti affetti da iperfenilalaninemia mild (22,9%) e 10 pazienti affetti da iperfenilalaninemia (20,8%).

Abbiamo trovato una buona correlazione genotipo-fenotipo. In 6 casi non abbiamo trovato questa corrispondenza. Tutti questi pazienti sono eterozigoti composti e tutti presentano, in un allele, la mutazione R261Q. Tale mutazione è stata identificata come inducente una complementazione inter-allelica negativa (107) che, conseguentemente, determina un fenotipo più severo di quanto atteso.

Troviamo però la mutazione R261Q in eterozigosi in altri 2 pazienti del nostro gruppo con fenotipo lieve, dove questo effetto negativo sembra non essersi espresso: nel primo soggetto, la mutazione R261Q si associa alla mutazione E390G, caratterizzata da una elevata attività enzimatica residua in vitro; nel secondo soggetto la R261Q si associa alla IVS4-5 C>G, mutazione non ancora caratterizzata dal punto di vista dell'attività enzimatica residua ma che si trova, in letteratura, in soggetti eterozigoti composti con fenotipi più severi.

#### *Genotipo e BH4 responsività*

Uno dei principali obiettivi del nostro studio è evidenziare la BH4 responsività della nostra popolazione di pazienti in modo da poter predire una potenziale risposta positiva all'utilizzo di questa nuova strategia terapeutica.

Delle 35 mutazioni identificate nella nostra popolazione studiata (*Tabella 5*), circa la metà (R261Q, R158Q, E390G, A300S, R243Q, Y414C, T380M, R408Q, E178G, S87R, D129G, I65T, A403V, IVS4-5 C>G, L48S) appartiene al gruppo delle circa 70 mutazioni identificate in pazienti BH4 responsivi, in accordo con il BIOPKU (*Fig.4*). La maggior parte si colloca nel dominio catalitico (9), dato anche questo conforme alla letteratura.

Di tutti i pazienti genotipizzati completamente, esclusi quelli affetti da iperfenilalaninemia e pertanto a dieta libera, 27 pazienti (75%) risultano potenzialmente responsivi alla BH4 (*Tabella 6*). Più della metà dei pazienti potenziali BH4 responders presenta l'appropriato fenotipo metabolico (PKU mild e HPA mild), mentre il 40,7% presenta un fenotipo da PKU classica; in questi ultimi l'effettivo beneficio al trattamento dovrà essere testato mediante test da carico con tetraidrobiopterina poiché, come rilevato in precedenza, questi pazienti sono portatori in eterozigosi della mutazione R261Q, nota per il possibile effetto negativo sulla complementazione inter-allelica.

I rimanenti 9 pazienti (25%) risultano non responders. Nel dettaglio: 5 pazienti con PKU classica; 3 pazienti con PKU mild (2 fratelli IVS11+17G>A/IVS4+5G>T, un paziente IVS10-11G>A/I406T); 1 paziente con iperfenilalaninemia mild (N223Y/R261X).

La mancata responsività alla BH4 nei pazienti con PKU classica era ovviamente attesa. Nei rimanenti 4 pazienti non tutte le mutazioni che ne caratterizzano il genotipo sono conosciute (N223Y) o, laddove sono già state descritte, non è nota l'attività enzimatica residua. Nei pazienti con fenotipo PKU mild identifichiamo la presenza di mutazioni nel sito di splicing che possono causare fenilchetonuria classica o mild a seconda del “trascritto” ( a volte, nonostante la mutazione, il trascritto è normale). Pertanto non è chiaro fino a che punto possano condizionare il fenotipo di questi pazienti.

## ***DISCUSSIONE***

Lo studio della nostra popolazione di pazienti, sotto il profilo molecolare, ha evidenziato un quadro generale di elevata eterogeneità genetica, conforme all' eterogeneità della popolazione del Sud Europa già ampiamente descritta (108-110) e che contrasta invece con i paesi del Nord e Ovest dell'Europa (111).

Abbiamo identificato 35 mutazioni, la maggior parte missenso, dato conforme alla letteratura. Inoltre è interessante notare come la mutazioni associate ad una certa quota di attività enzimatica residua (11), valutata tramite studi funzionali in vitro, eccedano quelle severe (10). Purtroppo un certo numero di mutazioni note, per l'esattezza 12 ( di cui 4 di splicing, 2 frameshift, 5 missenso, 1 stop), non sono state ancora studiate sotto il profilo funzionale. Inoltre due mutazioni identificate nel nostro studio non sono mai state descritte prima: la L287L e la N223Y.

Alcune mutazioni ricorrono nella nostra casistica, così come nella popolazione italiana secondo il database della McGill University, con una certa frequenza: IVS10-11 G>A (19.3%), R261Q (9.1%), R158Q (9.1%),



e A403V (5.7%). L'unico dato non conforme è la ricorrenza, nella nostra casistica, della mutazione R408Q che noi abbiamo riscontrato in 5 pazienti (6,8%), che risulta invece prevalente nelle regioni del nord Europa, in particolare Norvegia. Nonostante l'esigua casistica riteniamo sia un dato significativo vista l'elevata attività enzimatica residua associata alla mutazione e soprattutto la nota BH4 responsività.

La correlazione genotipo-fenotipo costituisce la chiave di volta di numerose malattie metaboliche ereditarie. In questo studio abbiamo realizzato queste correlazioni utilizzando i dati raccolti nel PAHdb, ottenuti in vitro tramite studi funzionali, dove l'attività enzimatica residua dell'enzima PAH risulta come la media delle attività enzimatiche residue di entrambe gli alleli mutati.

I nostri risultati rivelano una buona correlazione genotipo fenotipo, risultando inconsistenti in soli 6 casi. I pazienti in questione risultano tutti eterozigoti e portatori, su uno dei due alleli, della mutazione R261Q, già descritta da diversi autori come responsabile di una complementazione inter-allelica negativa, responsabile di un'espressione fenotipica più severa dell'atteso.

La valutazione della BH4 responsività dei nostri pazienti ha dato risultati incoraggianti. Questo dato è in accordo con l'elevata BH4 responsività rilevata nei pazienti PKU delle regioni del Sud Europa (69), grazie anche all'elevata frequenza di mutazioni BH4 responsive (R261Q, R158Q, I65T, L48S, V388M), rispetto l'Europa centrale (50-70%) o alcuni paesi dell'est Europa (<40%) dove ricorrono invece mutazioni severe (R408W, R252W, IVS12+1 G>A). Dato come assunto che la BH4 responsività correla con la presenza, su almeno uno dei due alleli, di mutazioni che si associno ad un'attività enzimatica residua considerevole, nei nostri pazienti abbiamo rilevato una prevalenza di tali mutazioni. Il 75% dei nostri pazienti risulta potenzialmente responsivo al trattamento con tetraidrobiopterina.

Sicuramente non è possibile prescindere, allo stato attuale, dall'esecuzione del test da carico con BH4 per valutare, in vivo, l'effettiva responsività al

trattamento, ma la caratterizzazione genotipica ci consente di effettuare la selezione una popolazione candidata al trattamento e di ottimizzare l'esecuzione del test su ciascun paziente (dose della BH4, durata del test, intervalli per il monitoraggio della fenilalaninemia).

### ***CONCLUSIONI***

La caratterizzazione genotipica dei pazienti affetti da iperfenilalaninemia deve entrare a far parte routinariamente dell'iter di conferma ed inquadramento diagnostico, soprattutto oggi viste le prospettive ed implicazioni in ambito terapeutico. Nonostante la correlazione genotipo-fenotipo non sia assoluta, l'analisi molecolare può fornire delle informazioni utili sia sui pazienti potenzialmente non BH4 responsivi, in quanto portatori di mutazioni associate ad un'attività enzimatica residua assente, ma soprattutto sui pazienti potenziali BH4 responsivi. I nostri pazienti risultano essere potenziali candidati all'utilizzo del nuovo trattamento con BH4, assunta in monoterapia o associata ad una dieta meno restrittiva, che potrebbe ridurre il rischio di complicanze di tipo nutrizionale e psicologico legate alla rigidità e monotonia al trattamento dieto-terapeutico long-life e migliorare drasticamente la qualità della vita dei nostri pazienti.

### ***PROSPETTIVE***

Grazie alla grande attenzione suscitata nell'ambito delle malattie metaboliche dall'efficacia di questo nuovo trattamento, prima l'Agenzia Europea del Farmaco, poi l'Agenzia Italiana del Farmaco, hanno approvato alla fine del 2009 la prescrivibilità, l'utilizzo e completa rimborsabilità della sapropterina dicloridrato, fino ad allora esclusivo appannaggio degli Stati Uniti, nei pazienti affetti da difetto di PAH adulti e pediatrici di età superiore ai 4 anni e affetti da difetto del metabolismo della BH4.

Quasi contemporaneamente è stato aperto uno nuovo studio, dall'acronimo SPARK (Safety Paediatric efficacy pharmacokinetic with Kuvan), di III fase b, multicentrico, Open Label, randomizzato, controllato, sull'efficacia,

sicurezza e farmacocinetica della sapropterina dicloridrato in pazienti fenilchetonurici di età inferiore ai 4 anni, a cui il nostro Centro sta prendendo parte, consentendoci di annoverare tra i pazienti candidati al trattamento anche bambini piccoli. Grazie a queste introduzioni e alla luce delle acquisizioni fatte in seguito allo studio genotipico dei nostri pazienti, abbiamo cominciato a sottoporre i nostri pazienti, identificati come potenziali fruitori del trattamento con BH4, a test da carico per verificare la nostra ipotesi.

Ad oggi, abbiamo sottoposto 10 pazienti (di età compresa tra 23 anni e 10 mesi, 8 femmine e 2 maschi), dei 27 identificati come potenzialmente responsivi al trattamento con BH4 sulla base del genotipo, a test da carico con BH4 (6 pazienti) o doppio carico con fenilalanina e BH4 (4 pazienti), secondo le modalità precedentemente descritte. Di questi 10 pazienti (*Tabella 7*) 7 si sono confermati BH4 responsivi: 2 assumono la sapropterina dicloridrato come monoterapia; 4 in associazione alla dieta a basso contenuto in fenilalanina con aumento della tolleranza individuale; l'ultima, la più piccola, è in procinto di iniziare la terapia. Tre pazienti sono risultati non responsivi.

Da questi dati preliminari possiamo provare a trarre qualche prima considerazione. I pazienti con fenotipo più lieve, come atteso, sono quelli che maggiormente si giovano del trattamento con BH4. In particolare: 2 pazienti sono a dieta libera (n° 11 e 37) e 4 pazienti associano alla terapia farmacologica una dieta meno restrittiva (n°24, 26, 43, 9 ). Questi 6 pazienti hanno tutti risposto in maniera significativa al test da carico (riduzione della fenilalaninemia >30% dopo 24 ore dall'assunzione della BH4). Presentano tutti, in eterozigosi, mutazioni con elevata attività enzimatica residua e con nota BH4 responsività. Tuttavia i pazienti n°11 e n°37 presentano fenotipo più lieve ed ottima risposta al trattamento; gli altri 4 (n°24,26,43,9) presentano fenotipo più severo, in due casi una risposta discreta al trattamento con aumento significativo della tolleranza (pazienti n° 43 e 9) e nei rimanenti due (n° 26 e 24) una risposta meno brillante. Siamo convinti

di poter annoverare tra i possibili fruitori del trattamento come monoterapia anche la più piccola (n°3), la quale presenta un fenotipo biochimico lieve, un'ottima risposta al test da carico e una mutazione, la R408Q, in omozigosi, associata ad elevata attività enzimatica residua e BH4 responsività.

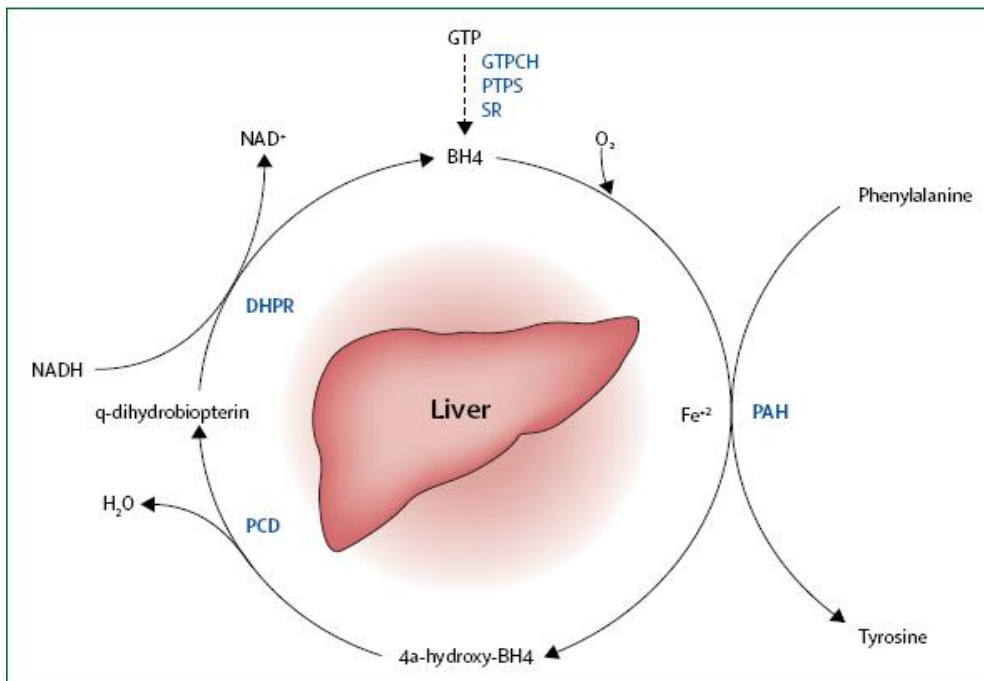
I 3 pazienti rimanenti (n° 39, 4, 15) presentano tutti un fenotipo più severo (PKU mild o Classica). Presentano tutti una bassa risposta al test da carico (<30%). Anche in questo caso sono tutti e 3 eterozigoti composti e presentano su un allele mutazioni severe (IVS 10-11 G>A, R158Q ), sull'altro allele, in due casi, mutazioni moderate con BH4 responsività nota (R408Q, R261Q), in un caso una mutazione nuova mai descritta in letteratura. L'unica spiegazione che al momento possiamo dare, riservandoci di voler meglio caratterizzare le mutazioni mai descritte in precedenza e quelle non ancora completamente approfondite dal punto di vista funzionale, è che l'associazione tra mutazioni lievi e mutazioni classiche che determinano la stessa attività enzimatica residua può produrre diversi fenotipi. Sicuramente un nuovo strumento che potrà esserci di aiuto, oltre i due database precedentemente descritti (PAHdb e BIOPKU), soprattutto per creare delle correlazioni genotipo-fenotipo, è lo studio multicentrico osservazionale KAMPER (Kuvan Adult Maternal Pediatric European Registry), a cui noi abbiamo aderito, per la raccolta dati su pazienti affetti da iperfenilalaninemia in follow-up, seguiti in vari Centri. Naturalmente queste sono solo prime considerazioni che necessitano di ulteriori approfondimenti. Ci riproponiamo, infatti, di continuare a caratterizzare dal punto di vista genotipico tutta la nostra casistica di pazienti in modo da poter raggiungere un migliore inquadramento diagnostico, poter delineare con più chiarezza e sempre più precocemente le prospettive terapeutiche, cercando di garantire loro una migliore qualità di vita.

**FIGURE E TABELLE**

**Fig.1: Meccanismo di idrossilazione della fenilalanina**

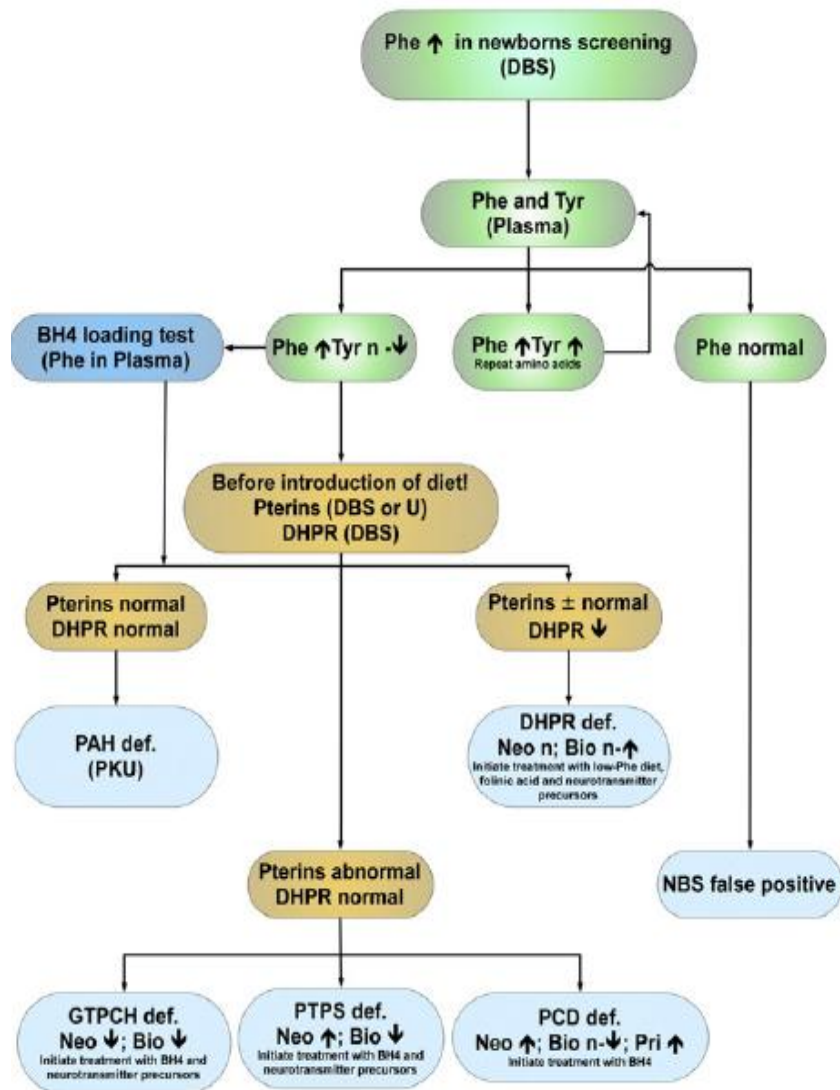
(tratto da N. Blau, F.van Spronsen, H.Levy "Phenylketonuria" Seminar Lancet 2010; 376:1417-27; pag1.418)

Nel processo di idrossilazione della fenilalanina, in presenza di ossigeno ( $O_2$ ) e Ferro ( $Fe^{+2}$ ), ad opera della fenilalanina idrossilasi (PAH), la tetraidrobiopterina ( $BH_4$ ) è ossidata a 4-OH-tetraidrobiopterina. Questa viene riconvertita in  $BH_4$  tramite due successive tappe enzimatiche ad opera, rispettivamente della pterina-4-alfa-carbinolamina deidratasi (PCD) e diidropteridina riduttasi. La  $BH_4$  viene sintetizzata a partire dalla guanosina trifosfato (GTP) ad opera di 3 enzimi: GTP ciclo idrolasi (GTPCH), 6-piruvil tetraidropterina sintasi (PTPS), sepiapterina riduttasi (SR).



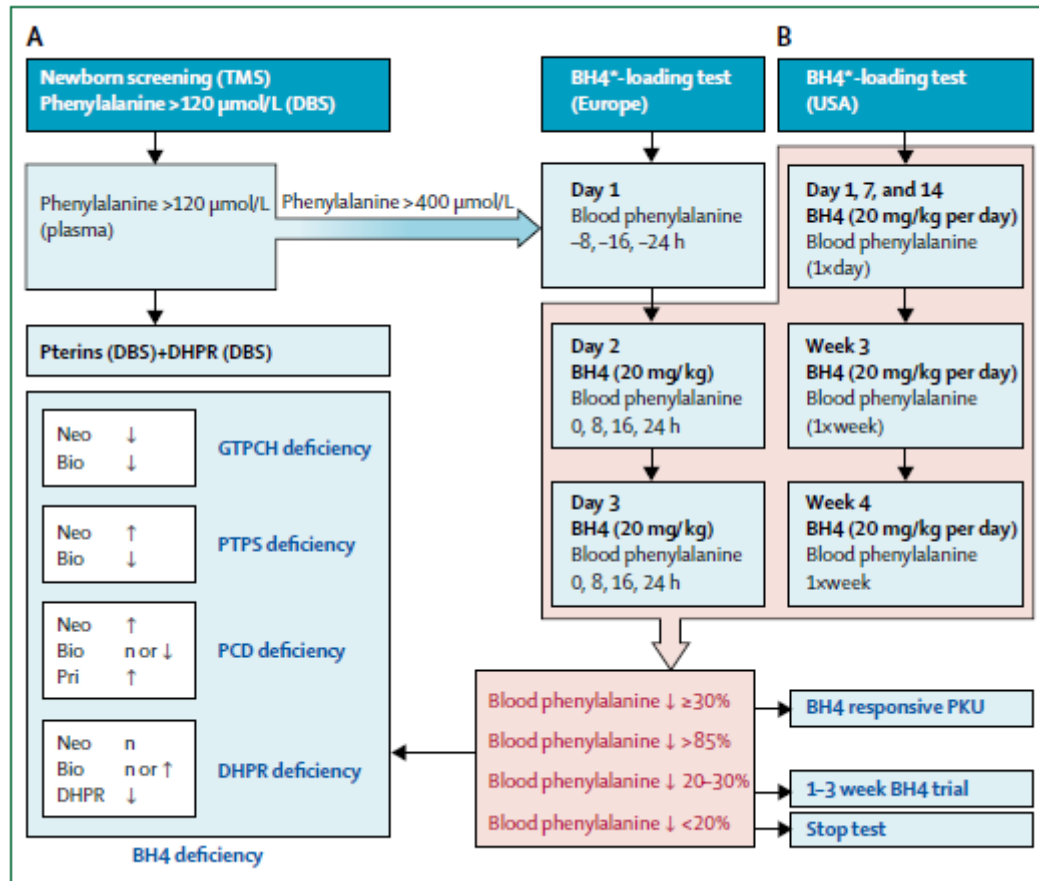
**Fig.2: Flow-chart diagnostica per la diagnosi differenziale delle iperfenilalaninemie da difetto di fenilalanina idrossilasi o da difetto di cofattore**

(tratto da N. Blau, J.B.Nennermann, U.Langenbeck, U.Lichter-Koneki "Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies" *Molecular Genetics and Metabolism* 104 (2011) S2-S9, pag.S4)



**Fig.3: Flow-chart diagnostica delle iperfenilalaninemie e modalità di esecuzione del test da carico con BH4 (in Europa ed Stati Uniti).**

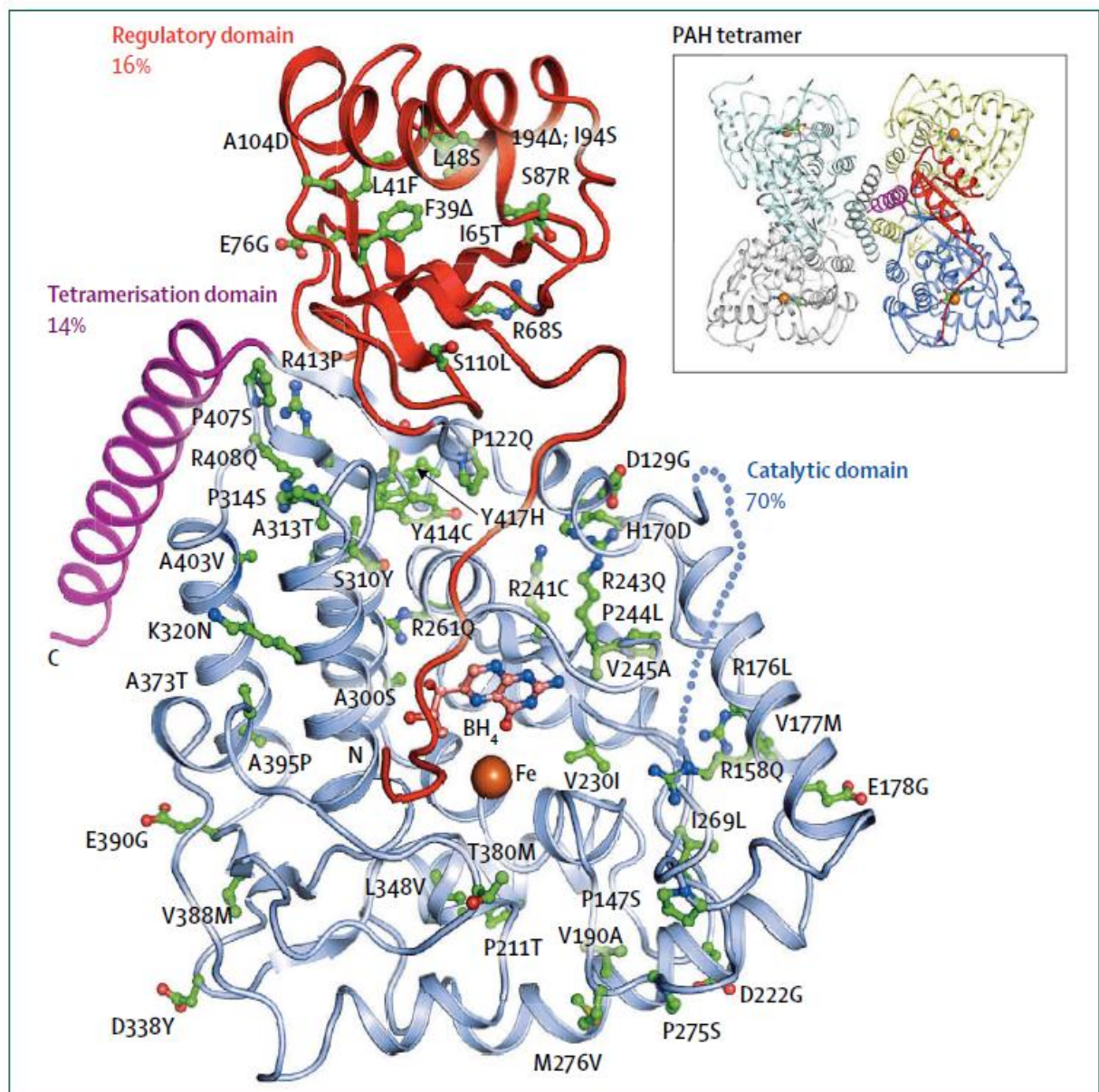
(tratto da N. Blau, F.van Spronsen, H.Levy “Phenylketonuria” Seminar Lancet 2010; 376:1417-27; pag1.420)





**Fig.4: Struttura tridimensionale dell'enzima fenilalanina idrossilasi nell'uomo ed identificazione delle posizioni delle principali mutazioni BH4 responsive.**

(tratto da N. Blau, F.van Spronsen, H.Levy "Phenylketonuria" Seminar Lancet 2010; 376:1417-27; pag1.422)



**Tabella 1: Parametri biochimici utili nella discriminazione delle diverse forme di difetto di tetraidrobipterina**

(tratto da N. Blau, J.B.Nennergmann, U.Langenbeck, U.Lichter-Koneki “Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies” *Molecular Genetics and Metabolism* 104 (2011) S2-S9, pag.S4)

| Deficiency | Neopterin | Biopterin        | Primaapterin | DHPR activity | Phe            |
|------------|-----------|------------------|--------------|---------------|----------------|
| PKU        | n-↑       | n-↑              | n            | n             | ↑              |
| GTPCH      | ↓         | ↓                | n            | n             | ↑ <sup>a</sup> |
| PTPS       | ↑         | ↓                | n            | n             | ↑              |
| PCD        | ↑         | ↓-n              | ↑            | n             | ↑              |
| DHPR       | n         | n-↑ <sup>a</sup> | n            | ↓             | ↑              |

<sup>a</sup> Può essere normale in epoca neonatale

**Tabella 2: Fattori che possono potenzialmente influenzare l’esito del test da carico con BH4**

(tratto da N. Blau, J.B.Nennergmann, U.Langenbeck, U.Lichter-Koneki “Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies” *Molecular Genetics and Metabolism* 104 (2011) S2-S9, pag.S4)

- BH4 dosage (higher sensitivity with 20 mg/kg v. 10 mg/kg)
- Duration of the test (24–48 h for initial screening v. 4–8 weeks for efficiency)
- Food intake (better GI absorption of BH4 with high calories food)
- Age (outcome may be different in newborns v. adolescents v. adults)
- Diet (better response to BH4 when out of diet and on higher blood Phe levels)
- GI absorption (may be individually different; monitor blood BH<sub>4</sub> levels)
- Genotype

**Tabella 3: Target terapeutico relativo i valori di fenilalaninemia (micromol/L) nei pazienti in dieta-terapia, suddivisi per nazione e fasce di età.**

(tratto da N. Blau, F.van Spronsen, H.Levy “Phenylketonuria” Seminar Lancet 2010; 376:1417-27; pag1.421)

|             | <2 years              | 2-6 years              | 7-9 years               | 10-12 years | 13-15 years             | >16 years              |
|-------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------|-------------------------|------------------------|
| Australia   | 100-350               | 100-350                | 100-350                 | 100-450*    | 100-450*                | 100-450*               |
| Austria     | 40-240                | 40-240                 | 40-240                  | 40-900      | 40-900                  | 40-1200                |
| Croatia     | 130-240               | 130-360                | 130-360                 | 130-600     | 130-600                 | 130-960                |
| Denmark     | 120-300<br>(<4 years) | 120-400<br>(4-8 years) | 120-600<br>(8-10 years) | 120-700     | 120-900                 | 120-900                |
| France      | 120-300               | 120-300                | 120-300                 | 120-600     | 120-900                 | 120-1200               |
| Germany     | 40-240                | 40-240                 | 40-240                  | 40-900      | 40-900                  | 40-1200                |
| Hungary     | 120-360               | 120-360                | 120-480                 | 120-480     | 120-480<br>(7-14 years) | 120-600<br>(>14 years) |
| Italy       | 120-360               | 120-360                | 120-360                 | 120-360     | 120-600                 | 120-600                |
| Japan       | 120-240               | 120-360                | 180-360                 | 180-480     | 180-600                 | 180-900                |
| Netherlands | 120-360               | 120-360                | 120-360                 | 120-360     | 120-600                 | 120-600                |
| Poland      | 120-360               | 120-360                | 120-360                 | 120-720     | 120-720                 | 120-720                |
| Portugal    | 120-360               | 120-360                | 120-360                 | 120-360     | 120-480                 | 120-480                |
| Spain       | <360                  | <360                   | <480                    | <480        | <720                    | <720                   |
| Switzerland | 100-300               | 100-400                | 100-400                 | 100-600     | 100-600                 | 100-600                |
| Turkey      | 60-240                | 60-240                 | 60-240                  | 60-240      | 60-240                  | 60-240                 |
| UK          | 120-360               | 120-360                | 120-480                 | 120-480     | 120-700                 | 120-700                |
| USA         | 120-360               | 120-360                | 120-360                 | 120-360     | 120-600                 | 120-900                |

\*Some phenylketonuria centres accept a concentration of less than 700 µmol/L.

**Tabella 4: Tabella relativa il rapporto genotipo-fenotipo nei nostri 48 pazienti**

**ARP è l'attività enzimatica residua ottenuta tramite studi funzionali *in vitro*;**

***n.d.* Non determinata**

| Pazienti | Phe<br>pre-dg (mg/dl) | Allele 1      | ARP             | Allele 2      | ARP             | Fenotipo |
|----------|-----------------------|---------------|-----------------|---------------|-----------------|----------|
| 1        | 26                    | P281L         | <1%             | R158Q         | 10%             | CLASSICA |
| 2        | 4                     | R261Q         | 38,50%          | E390G         | 72%             | HPA      |
| 3        | 8                     | R408Q         | 50%             | R408Q         | 50%             | HPA MILD |
| 4        | 12,3                  | L287L         | n.d.            | R158Q         | 10%             | PKU MILD |
| 5        | 4,4                   | S16fsX17      | 0,00%           | A300S         | 31%             | HPA      |
| 6        | 10,1                  | R243Q         | 23%             | Y414C         | 36%             | PKU MILD |
| 7        | 32                    | IVS12 +1 G>A  | <1%             | IVS8 -7 A>G   | 0%              | CLASSICA |
| 8        | 2,3                   | IVS2 -13 T>G  | n.d.            | T380M         | n.d.            | HPA      |
| 9        | 12                    | R408Q         | 50%             | R158Q         | 10%             | PKU MILD |
| 10       | 7                     | I174V         | mild            | R158Q         | 10%             | HPA MILD |
| 11       | 9                     | E178G         | 39%             | IVS10 -11 G>A | <1%             | HPA MILD |
| 12       | 3,4                   | S87R          | 82%             | IVS10 -11 G>A | <1%             | HPA      |
| 13       | 11,4                  | IVS10-11G>A   | <1%             | D129G         | n.d.            | PKU MILD |
| 14       | 44                    | IVS12+1G>A    | <1%             | IVS12 +1 G>A  | <1%             | CLASSICA |
| 15       | 25                    | R261Q         | 38,50%          | R158Q         | 10%             | CLASSICA |
| 16       | 14                    | IVS11+17G>A   | n.d.            | IVS4+5G>T     | 0%              | PKU MILD |
| 17       | fs                    | IVS11+17G>A   | n.d.            | IVS4+5G>T     | 0%              | PKU MILD |
| 18       | 23                    | W187C         | 1%              | R261Q         | 38,5%           | CLASSICA |
| 19       | 35                    | IVS7+5G>A     | n.d.            | IVS10 -11 G>A | <1%             | CLASSICA |
| 20       | 5,2                   | I65T          | 25%             | A403V         | 32%             | HPA      |
| 21       | 8,5                   | N223Y         | n.d.            | R261X         | 0%              | HPA MILD |
| 22       | 7,5                   | IVS4-5 C>G    | mild            | IVS10 -11 G>A | <1%             | HPA MILD |
| 23       | 26                    | IVS10 -11 G>A | <1%             |               |                 | CLASSICA |
| 24       | 27,8                  | IVS10 -11 G>A | <1%             | R261Q         | 38,5%           | CLASSICA |
| 25       | 11,08                 | R158Q         | 10%             | R408Q         | 50%             | PKU MILD |
| 26       | 9,5                   | R408Q         | 50%             | R176X         | 0% <sup>a</sup> | PKU MILD |
| 27       | 23                    | F55fsX        | 0,00%           | R261Q         | 38,5%           | CLASSICA |
| 28       | 7,2                   | A403V         | 32%             | R243X         | 0%              | HPA MILD |
| 29       | 31                    | R261Q         | 38,50%          | R111X         | 0%              | CLASSICA |
| 30       | 29                    | IVS10 -11 G>A | <1%             | R158Q         | 10%             | CLASSICA |
| 31       | 2,5                   | T380M         | n.d.            | I406T         | mild            | HPA      |
| 32       | 3,6                   | T380M         | n.d.            | I406T         | mild            | HPA      |
| 33       | 3,2                   | D145V         | mild            | R261X         | 0%              | HPA      |
| 34       | 7,6                   | IVS4-5 C>G    | mild            | R261Q         | 38,5%           | HPA MILD |
| 35       | 52,3                  | R158Q         | 10%             | IVS4 +5G>T    | 0%              | CLASSICA |
| 36       | 37                    | I65T          | 25%             | IVS8 -7 A>G   | 0%              | CLASSICA |
| 37       | 8                     | A300S         | 31%             | IVS10 -11 G>A | <1%             | HPA MILD |
| 38       | 28                    | P281L         | <1%             | L48S          | 39%             | CLASSICA |
| 39       | 15,3                  | R408Q         | 50%             | IVS10 -11 G>A | <1%             | PKU MILD |
| 40       | 33,7                  | F55fsX        | 0% <sup>a</sup> | R261Q         | 38,5%           | CLASSICA |
| 41       | fs                    | IVS10 -11 G>A | <1%             | IVS10 -11 G>A | <1%             | CLASSICA |
| 42       | fs                    | IVS10 -11 G>A | <1%             | IVS10 -11 G>A | <1%             | CLASSICA |
| 43       | 10                    | IVS10 -11 G>A | <1%             | I406T         | mild            | PKU MILD |
| 44       | 6,4                   | R261X         | 0%              | A300S         | 31%             | HPA MILD |
| 45       | 7                     | D129G         | n.d.            |               |                 | HPA MILD |
| 46       | 3,75                  | A403V         | 32%             | IVS10 -11 G>A | <1%             | HPA      |
| 47       | 7,5                   | IVS10 -11 G>A | <1%             | A403V         | 32%             | HPA MILD |
| 48       | 3,2                   | F55fsX        | 0% <sup>a</sup> | A403V         | 32%             | HPA      |

**Tabella 5: Tabella relativa la potenziale BH4 responsività delle singole mutazioni riscontrate nei nostri 48 pazienti e relativa frequenza.**

| Mutazioni PAH | Alleli (n°) | Attività residua PAH | BH4 responsività |
|---------------|-------------|----------------------|------------------|
| R261Q         | 8           | 38.5                 | +                |
| P281L         | 2           | <1%                  | -                |
| R158Q         | 8           | 10%                  | +                |
| E390G         | 1           | 72.5%                | +                |
| L287L         | 1           | new                  |                  |
| A300S         | 3           | 31%                  | +                |
| R243Q         | 1           | 23%                  | +                |
| Y414C         | 1           | 36%                  | +                |
| IVS12 +1 G>A  | 2           | <1%                  | -                |
| IVS8 -7 A>G   | 2           | 0                    | ?                |
| IVS2 -13 T>G  | 1           | ?                    | ?                |
| T380M         | 2           | ?                    | +                |
| R408Q         | 6           | 49.7%                | +                |
| I174V         | 1           | n.d.                 |                  |
| E178G         | 1           | 39%                  | +                |
| IVS10 -11 G>A | 15          | <1%                  | ?                |
| S87R          | 1           | 82%                  | +                |
| D129G         | 2           | ?                    | +                |
| IVS11+17G>A   | 1           | n.d.                 |                  |
| W187C         | 1           | 1%                   |                  |
| IVS7+5G>A     | 1           | ?                    | ?                |
| I65T          | 2           | 25.3%                | +                |
| A403V         | 5           | 32%                  | +                |
| N223Y         | 1           | new                  |                  |
| R261X         | 2           | 0                    | -                |
| IVS4-5 C>G    | 2           | n.d.                 | +                |
| R176X         | 1           | n.d.                 | -                |
| F55fsX        | 3           | n.d.                 |                  |
| S16fsX17      | 1           | n.d.                 |                  |
| R243X         | 1           | 0                    | -                |
| R111X         | 1           | 0                    | -                |
| I406T         | 2           | n.d.                 |                  |
| D145V         | 1           | n.d.                 |                  |
| IVS4 +5G>T    | 1           | 0                    | ?                |
| L48S          | 1           | 39%                  | +                |

**Tabella 6: Classificazione dei nostri pazienti in BH4 responsivi (portatori di almeno una mutazione nota per essere BH4 sensibile) e non BH4 responsivi.**

---

|   |    |         |
|---|----|---------|
| <b>Pazienti potenzialmente BH4 responsivi :</b> |    |         |
| PKU classica                                    | 11 | (40.7%) |
| PKU Mild  | 7  | (25.9%) |
| HPA Mild  | 9  | (33.3%) |
| <br><b>Pazienti non BH4 responsivi:</b>         |    |         |
| PKU classica                                    | 5  | (55.5%) |
| PKU Mild  | 3  | (33.3%) |

**Tabella 7: Pazienti sottoposti a test da carico con BH4. I valori espressi da T0 e T48 rappresentano i valori di fenilalaninemia (espressi in mg/dl) determinati al tempo 0 e dopo, rispettivamente, 4,8,24,48 ore dall'assunzione del cofattore nel test da carico con BH4; dopo 3,7,11,24 ore dall'assunzione del cofattore nel doppio carico con fenilalanina e BH4. Si evidenziano: i pazienti responsivi o meno al test, in rapporto alla riduzione dei valori della fenilalaninemia dopo 24 dall'assunzione del cofattore, come si modifica la tolleranza individuale alla fenilalanina in relazione all'inizio del trattamento con sapropterina dicloidrato**

| Pz | Genotipo             | Fenotipo     | T0   | T3   | T4   | T7   | T8   | T11  | T24  | T48  | Risp | Risp. 24 ore (%) | Toll. pre | Toll. pos | Tp BH4   |
|----|----------------------|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------|-----------|-----------|----------|
| 11 | E178G/ IVS10-11 G>A  | HPA MILD     | 8,1  | 9,3  |      | 9,3  |      | 4,3  | 2,6  |      | si   | 72               | 700       | d.l.      | 10mg/kg  |
| 26 | R176X/ R408Q         | PKU MILD     | 7,9  | 20,6 |      | 20,8 |      | 14,5 | 9,4  |      | si   | 54               | 800       | 900       | 20mg/kg  |
| 24 | R261Q/IVS10-11 G>A   | PKU CLASSICA | 19,5 |      | 15,4 |      | 15,1 |      | 14,9 | 10,4 | si   | 46               | 630       | 800       | 20mg/kg  |
| 37 | IVS10-11 G>A / A300S | HPA MILD     | 6,2  |      | 2,5  |      | 2,1  |      | 1,5  |      | si   | 75               | 1300      | d.l.      | 10mg/kg  |
| 39 | R408Q /IVS10-11G>A   | PKU MILD     | 10,9 |      | 9,3  |      | 9,5  |      | 8,9  |      | no   | 18               | 723       | 723       | no       |
| 43 | I406T/IVS10-11G>A    | PKU MILD     | 3,1  | 9,3  |      | 8,4  |      | 7,5  | 3,2  |      | si   | 65               | 800       | 1400      | 10 mg/kg |
| 3  | R408Q/R408Q          | HPA MILD     | 6,2  |      | 2,9  |      | 2,8  |      | 1,2  | 1,6  | si   | 74               | 500       | i.c.      | i.c.     |
| 4  | L287L/R158Q          | PKU MILD     | 8,5  | 12   |      | 13   |      | 15   | 9    |      | no   | 25               | 250       | 250       | no       |
| 15 | R261Q/R158Q          | PKU CLASSICA | 9,4  |      | 7,9  |      | 7,4  |      | 7,3  | 8,6  | no   | 9                | 500       | 500       | no       |
| 9  | R408Q/R158Q          | PKU MILD     | 6,4  |      | 5    |      | 4,9  |      | 4,1  |      | si   | 36               | 800       | 1100      | 20mg/kg  |

## **BIBLIOGRAFIA**



1. C.R. Scriver, S. Kaufman "Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency". In C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle, B. Childs, B. Vogelstein (Eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited metabolic disease*, Mc Graw-Hill, New York, 2001
2. J.G. Loeber "Neonatal Screening in Europe: the situation in 2004" *J Inher Metab Dis* 2007; 30:430-38
3. I. Ozalp, T. Coskun, A. Tokatli, et al. "Newborn PKU screening in Turkey: at present and organization for future" *Turk J Pediatr* 2001; 43: 97-100.
4. J. Zschocke, J.P. Mallory, H.G. Eiken, N.C. Nevin "Phenylketonuria and the people of northern Ireland" *Hum Genet* 1997; 100:189-94.
5. Rapporto tecnico sui programmi di screening neonatale in Italia anno 2010 - Società Italiana per lo studio delle Malattie Metaboliche Ereditarie e lo Screening Neonatale (SIMMESN)
6. R. Surtees, N. Blau "Neurochemistry of phenylketonuria" *Eur J Pediatr* 2000; 159:109-13
7. K.D. Pearse, A.D. Gean Marton, H.L. Levy, K.R. Davis "Phenylketonuria: MR imaging of the brain with clinical correlation" *Radiology* 1990; 177:437-40
8. P.J. Anderson, S.J. Wood, D.E. Francis, L. Coleman, V. Anderson, A. Boneh "Are neuropsychological impairment in children with early-treated phenylketonuria (PKU) related to white matter abnormalities or elevated phenylalanine levels?" *Dev Neuropsychol* 2007; 32:645-68
9. J. Pietz, R. Kreis, A. Rupp, et al. "Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria" *J. Clin Invest* 1999; 103:1169-78
10. M. Hoeksma, D.J. Reijngoud, J. Pruim, H.W. de Valk, A.M. Paans, F.J. Van Spronsen "Phenylketonuria: high plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis" *Mol Genet Metab* 2009; 96:177-82

11. F.H.Orster, M.A. Schwab, S.W. Sauer, et al. "Phenylalanine redicessynaptic density in mixed cortical cultures from mice" *Pediatr Res* 2006; 59:544-48
12. A.E.Martynyuk, A.V. Glushakov, C.Sumners, P.J. Laipis, D.M. Dennis, C.N. Seubert "Impaired glutamatergic synaptic transmission in the PKU brain" *Mol Genet Metab* 2005; 86 (suppl.1): 34-42
13. S.Shefer, G.S.Tint, D. Jean-Guillaume, et al. "Is there a relationship between 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme a reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse?" *J Neurosci Res* 2000; 61:549-63
14. A.Ghozlan, O.Varoquaux, V.Abadie "Is monoamine oxydase-B a modifying gene and phenylethylamine a harmful compound in phenylketonuria?" *Mol Genet Metab* 2004;83:337-40.
15. I.Folling "The discovery of Phenylketonuria" *Acta Paediatr Suppl* (1994) 407: 4-10
16. H. Bieckel, J.W.Gerrard, H.M. Nickmans "Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria" *Lancet* 1953; 2:812-19.
17. R.Guthrie, A.Susi "A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants" *Pediatrics* 1963; 32: 338-43.
18. D.H.Chace, J.E.Sherwin, S.L.Hillman, F.Lorey, G.C.Cunningham "Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of aerly discharge speciements collected in the first 24 hours". *Clin.Chem.* 44 (1998); 2405-2409.
19. M.Zaffanello, G.Zamboni, C.Maffeis, L.Tato "Neonatal birth parameters of positive newborns at PKU screening as predictors of false-positive and positive results at recall-testing" *J.Med. Screen* 10 (2003) 181-183
20. Phenylketonuria (PKU): screening and management, NIH consens, Statement 17 (2000) 1-33

21. J.W. Eastman, J.E. Sherwin, R.Wong, C.L. Liao, R.J. Currier, F.Lorey, G.Cunningham "Use of phenylalanine:tyrosine ratio to test newborns for phenylketonuria in a large public health screening programme" *J.Med. Screen.* 7 (2000) 1-33.
22. N.Blau, B.Thony, R.G.H. Cotton, K.Hyland "Disorders of tetrahydrobiopterin and related biogenic amines" in C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D.Valle, B.Childs, B. Vogelstein (Eds.) *The metabolic and molecular basis of inherited metabolic disease*, Mc Graw-Hill, New York, 2001, pp.1725-1776.
23. B.Thony, N.Blau "Mutation in the Bh4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropterine reductase genes" *Hum.Mutat* 2006; 27: 870-78
24. N.Blau, A. Belanger Quintana, M.Demirkol, et al. "Management of phenylketouria in Europe: survey results from 19 countries". *Mol. Genet. Metab* 2010; 99: 109-15
25. N.Blau, L.Bonafè, M.Blaskovics "Disorders of phenylalanine and tetrahydrobiopterin metabolism" In: N.Blau, M.Duran, M.Blaskovics, K.M.Gibson, eds.*Physicians' guide to the laboratory diagnosis of metabolic disease*. Heidelberg: Springer, 2005:89-106
26. H.C. Curtius, A. Niederweiser, M. Viscontini, A.Otten, J. Schaub, S. Scheinbenreiter, H. Schimdt "Atypical phenylketonuria due to tetrahydrobiopterin deficiency. Diagnosis and treatment with tetrahydrobiopterin, dihydrobiopterin and sepiapterin" *Clin Chim Acta* 93(1979) 251-262
27. A.Ponzone, O.Guardamagna, I.Dianziani, R.Ponzone, G.B. Ferrero, M.Spada, R.G.H.Cotton "Catalytic activity of tetrahydrobiopterin in dihydropteridine reductase deficiency and indications for treatment" *Pediatr Res* 33 (1993)125-128
28. A.C. Muntau, W. Roschinger, M.Habich, H.Demmelmair, B.Hoffmann, C.P. Sommerhoff, A.A. Roscher "Tetrahydrobiopterin as an

- alternative treatment for mild phenylketonuria” *N.Engl.J.Med* 347 (2002) 2122-2132
29. C. Bernegger, N. Blau, “High frequency of tetrahydrobiopterin responsiveness among hyperphenylalaninemias: a study of 1919 patients observed from 1988 to 2002” *Mol Genet Metab* 77 (2002) 304-313
  30. B. Fiege, N. Blau “Assesment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria” *J. Pediatr* 150 (2002) 627-630
  31. H.Levy, A. Milanowski, A. Chakrapani, M. Cleary, P.Lee, F.K. Trefz, C.B. Whitley, F.Feillet, A.S. Feigenbaum, J.D. Bechuk, H. Christ-Schmidt, A. Dorembaum “Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase II randomized placebo-controlled study” *Lancet* 370 (2007) 504-510
  32. N. Blau “Sapropterin dihydrochloride for phenylketonuria and tetrahydrobiopterin deficiency” *Expert. Rev. Endocrinol.Metab.* 5 (2010) 483-494
  33. H.Levy, B. Burton, S. Cederbaum, C. Scriver “Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH4) in phenylketonuria and its use in treatment”, *Mol Genet Metab* 92 (2007) 287-291
  34. N. Blau “Defining tetrahydrobiopterin (BH4)- responsiveness in PKU *J. Inherit Metab Dis* 2008; 31:2-3
  35. N.Blau, A. Belanger Quintana, M.Demirkol, et al “Optimizing the use of sapropterin (BH4) in the management of phenylketonuria” *Mol. Genet. Metab* 2009; 96: 158-63
  36. N. Blau, U.Lagenbeck, J.B. Hennermann, U.Lichter Konecki “Diagnosis and management of PKU: an international survey” *J Inherit Metab Dis* (abstract), 34 suppl3 (2011) S97
  37. K. Hyland, R.A.H. Surtees, S.J.R. Heales, A. Bowron, D.W. Howells, I.Smith “Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of

- serotonin and dopamine in a pediatric reference population” *Pediatr Res.* 34 (1993) 10-14
38. G. Zorzi, B. Thony, N. Blau “Reduced nitric oxide metabolites in CSF of patients with tetrahydrobiopterin deficiency” *J neurochem* 80 (2002) 362-364
  39. C.Romano, A.Balsamo, M.Burroni, A.Cardillo, F.Carnevale, U.Caruso, R.Cerone, R.Ciatti, M.Cioni, C.Corbetta, L.Dotti, A.Impellizzeri, A.Lelli, V.Leuzzi, F.Lilliu, S.Pagliardini, S.Piazzi, R.Principi, S.Salardi, M.C.Schiaffino “Accertamento diagnositico, nosografico, principi di trattamento delle iperfenilalaninemie” *Riv. Ital Pediatr (IJP)* 1997; 23:1040-1044
  40. M. Lindner “Treatment of phenylketonuria varinats: European reccomandations. In: Blau N, ed PKU and BH4: advances in phenylketonuria and tetrahydrobiopterin. Heilbronn: SPS Verlagsgesellschaft mbH, 2006: 180-87
  41. F.Guttler “Hyperphenylalaninemia diagnosis and classification of various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood” *Acta Pediat Scand* 1980; 280: 1-80
  42. P. Guldberg, F. Rey, J. Zschocke, V. Romano, B. Francois, L.Michieli, K. Ullrich, G.F. Hoffmann, P. Burgard, H. Schmidt, C. Meli, E.Riva, I. Dianziani, A. Ponzzone, J. Rey, F. Guttler “ A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype” *Am J hum Genet* 63 (1998) 71-79
  43. P. Guldberg, F. Guttler “ Mutations in the phenyllanine hydroxylase gene: methods for their characterization” *Acta Paediatr Suppl.* 407 (1994), 27-33
  44. F.J. van Spronsen, M. van Rijn, B. Dorgelo, M. Hoeksma, A.M. Bosch, M.F. Mulder, J.B. De Klerk, T. de Konig, M.E. Rubio-Gozalbo, M. de Vries, P.H. Verkerk “Phenylalanine tolerance can already reliably been

- assessed at the age of 2 years in patients with PKU” *J Inherit Metab Dis* 32 (2009) 27-31
45. E.L. Macleod, s.T. Gleason, S.C. Van Calcar, D.M. Ney “Reassessment of phenylalanine tolerance in adults with phenylketonuria is needed as body mass changes” *Mol Genet Metab* 98 (2009) 331-337
  46. V. Anastasoie, L. kurzius, P.forbes, S. Waisbren “ Stability of blood phenylalanine levels and IQ in children with phenylketonuria” *Mol Genet Metab* 95 (2008) 17-20
  47. M. Humphrey, J. nation, I.francis, A. Boneh “effect of tetrahydrobiopterin on Phe/Tyr ratios and variation in Phe levels in tetrahydrobiopterin responsive PKU patients” *Mol Genet Metab* (2011), doi: 10.1016/j.ymgme.2011.1005.1011
  48. H. Ichinose, T. Ohye, E. Takahashi, et al. “hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutation in the GTP cyclohydrolase I gene” *Nat Genet* 1994; 8: 236-41
  49. L.Bonafè, B. Thony, J.M. Penzien, B. Czarnecki, N. Blau “ Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia” *Am J Hum Genet* 2001; 69:269-77
  50. The Maternal Phenylketonuria Collaborative Study: a status report (1994) *Nutr Rev* 52: 390-393
  51. J. Pietz, C.Benninger, H. Schmidt et al “Long term development of intelligence (IQ) and EEG in 34 children with phenylketonuria treated early” *Eur J Pediatr* 1988; 147:361-367
  52. National Institutes of Health (NIH) to host a consensus development conference on screening and management for phenylketonuria (PKU) *Pediatr Nurs* 2000; 26:539
  53. F.J. Van Spronsen, K.K.Ahring, M.Gizewska “PKU-What is daily practice in various centres in Europe? Data from a questionnaire by the scientific advisory committee of the European society of phenylketonuria and allied disorders” *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: 58-64

54. J.H. Walter, F.J. White “ Blood phenylalanine control in adolescents with phenylketonuria” *Int J Adolesc Med Health* 2004, 16:41-5
55. M.R. Crone, F.J. Van Spronsen, K. Oudshoorn, J Bekhof, G. van Rijn, P.H. Verkerk “Behavioural factors related to metabolic control in patients with phenylketonuria” *J Inherit Metab Dis* 2005; 28: 627-37
56. G.M. Olsson, S.M. Montgomery, J. Alm “Family conditions and dietary control in phenylketonuria” *J Inherit Metab Dis* 2007; 30:708-15
57. J. Bekhof, F.J. Van Spronsen, M.R. Crone, M van Rijn, C.G. Oudshoorn, P.H. Verkerk “Influence of knowledge of the disease on metabolic control in phenylketonuria” *Eur J Pediatr* 2003; 162:440-42
58. C.E. Laclair, D.M. Ney, E.L. MacLeod, M.R. Etzel “Purification and use of glycomacropeptide for nutritional management of phenylketonuria” *J Food Sci* 2009; 74: E199-206
59. D.M. Ney, S.T. Gleason, S.C. Van Calcar, et al “Nutritional management of PKU with glycomacropeptide from cheese whey” *J. Inherit Metab Dis* 2009; 32:32-39
60. K. Lim, S.C. Van Calcar, K.L. Nelson, S.T. Gleason, D.M. Ney “Acceptable low-phenylalanine foods and beverages can be made with glycomacropeptide from cheese whey for individuals with PKU” *Mol Genet Metab* 2007; 92: 176-178
61. S.C. Van Calcar, E.L. MacLeod, S.T. Gleason, et al “ Improved nutritional management of phenylketonuria by using a diet containing glycomacropeptide compared with amino acids” *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1068-77
62. R. Matalon, K Michals-Matalon, G.Bhatia, et al “”Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: effect on blood phenylalanine” *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 153-158
63. M.J. Mac Donald, G.B. D'Cunha “A modern view of phenylalanine ammonia lyase” *Bioch Cell Biol* 2007; 85: 273-82
64. C.N. Sarkissian, A. Gamez, L. Wang, et al. “Preclinical evaluation of multiple species of PEGylated recombinant phenylalanine ammonia lyase

- for the treatment of phenylketonuria” *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 52:20894-99
65. T.S. Kang, L.Wang, C.N. Sarkissian, A. Gamez, C.R. Scriver, R.C. Stevens “Converting an injectable protein therapeutic into an oral form: phenylalanine ammonia lyase for phenylketonuria” *Mol Genet Metab* 2010; 99:4-9
  66. A. Rebuffat, C.O.Harding, Z. Ding, B.Thony “Comparison of AAV pseudotype 1,2, and 8 vectors administered by intramuscular injection in the treatment of murine phenylketonuria” *HumGene Ther* 2010; 21:463-77
  67. Z. Ding, C.O.Harding, A Rebuffat, L.Elzaouk, J.A.Wolff, B.Thony “Correction of murine PKU following AAV-mediated intramuscular expression of a complete phenylalanine hydroxylating system” *Mol Ther* 2008; 16: 673-81
  68. C.O. Harding “Progress toward cell-directed therapy for phenylketonuria” *Clin Genet* 2008; 74: 97-104
  69. M.R.Zurfluh, J Zschocke, M. Lindner, et al “Molecular genetics of tetrahydrobiopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency” *Hum Mutat* 2008; 29: 167-75
  70. S.Kure, DC Hou, T Ohura, et al “Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency” *J Pediatr* 1999; 135: 375-78
  71. E. Kayaalp, E. Treacy, P.J.Waters, S.Byck, P.Nowacki, C.R. Scriver “Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a meta-analysis of genotype-phenotype correlations” *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1309-17
  72. L.Levy, A. Milanowski, A. Chakrapani, et al “Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH<sub>4</sub>) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomized placebo-controlled study” *Lancet* 2007; 370: 504-10
  73. P.Lee, E.P.Treacy, E. Crombez, et al “Safety and Efficacy of 22 weeks of treatment with sapropterin dihydrochloride in patients with phenylketonuria” *Am J Gent A* 2008; 146: 2851-59



74. R.Gassio, M.A.Vilaseca, N. Lambruschini, C. Boix, M.E.Fuste, J. Campistol “ Cognitive functions in patients with phenylketonuria in long-term treatment with tetrahydrobiopterin” *Mol gent Metab* 2010; 99 (suppl.): 75-78
75. I. Smith, M.G. Beasley, A.E. Ades “Intelligence and quality of dietary treatment in phenylketonuria” *Arch Dis Child* 1990; 65: 472-478
76. I. Smith, M.G. Beasley, A.E. Ades “Effect on intelligence of relaxing the low phenylalanine diet in phenylketonuria” *Arch Dis Child* 1991; 66:311-316
77. P. Burgard, R. Link, S. Schweitzer- Krantz “Phenylketonuria. Evidence-based clinical practice. Summary of the roundtable discussion”. *Eur J Pediatr* 2000; 159 (Suppl 2): S163-S168
78. G. Lundstedt, A. Johansson, L. Melin et al “Adjustment and intelligence among children with phenylketonuria in Sweden”. *Acta Paediatr* 2001; 90: 1147-1152
79. M. Welsh, B. Pennington “Phenylketonuria”. *Pediatric Neuropsychology* 2000; pp275-299
80. M.A. Cleary, J.H. Walter, J.E. Wraith et al “Magnetic resonance imaging in phenylketonuria: reversal of cerebral white matter change”. *J Pediatr* 1995; 127: 251-255
81. B. Schulz, H.J. Bremer “Nutrient intake and food consumption of adolescent and young adults with phenylketonuria”. *Acta Paediatr* 1995; 84: 743-748.
82. W.B. Hanley, A. Feigenbaum, J.T. Clarke, W. Schoonheydt, V. Austin “Vitamin B12 deficiency in adolescent and young adults with phenylketonuria”. *Lancet* 1993; 342: 997.
83. P.J. Lee, I. Smith, M. Lilburn, A.T. Piesowicz, D.P. Brenton “Symptomatic vitamin B12 deficiency after anaesthesia in phenylketonuria (PKU)”. *J Inher Metab Dis* 1998;21(Suppl 2): 13.
84. M. Robinson, F.J. White, M.A. Cleary, K.L. Wayne, J.H. Walter “Increased risk of vitamin B12 deficiency in patients with phenylketonuria

- on an unrestricted or relaxed diet". The Journal of Pediatrics 2000; 136 (4): 545-547
85. H. Przyrembel, H.J. Bremer "Nutritional, Physical growth and bone density in treated phenylketonuria" Eur J Pediatr 2000; 159 (Suppl 2): S129-S135
  86. J. Allen, I.R. Humphries, D.L. Waters, C.K. Roberts, A.H. Lipson; Howman-Giles RG, Gaskin KJ "Decreased bone mineral density in children with phenylketonuria". Am J Nutr 1994; 59: 419-422.
  87. J.L. Bodley, V.J. Aystin, W.B. Hanley, J.T.R. Clarke, S. Zlotkin "Low iron stores in infants and children with treated phenylketonuria: a population at risk for iron-deficiency anemia and associated cognitive deficits". Eur J Pediatr 1993; 152: 140-143.
  88. P.B. Acosta, C. Greene, S. Yannicelli, M. Korson, F. Rohr, L. Yooper, J. Williams, S. Mofidi "Nutrition studies in treated infants with phenylketonuria". Int Pediatr 1993; 8: 63-73.
  89. P.B. Acosta "Nutrition studies in treated infants with phenylketonuria: vitamins, minerals, trace elements". Eur J Pediatr 1996; 155 (Suppl 1): S136-S139.
  90. F.Jochum, K. Terwolbeck, H. Meinhold, D.Behne, H. Menzel, I.Lombeck "Is there any risk of low dietary selenium suppli in PKU-children?". Nutr Res 1999; 19: 349-360.
  91. M.M. Van Bakel, G.Printzen, B.Wermuth , U.N. Wiesmann "Antioxidant and thyroid hormone status in selenium-deficient phenylketonuric and hyperphenylalaninemic patients". Am J Nutr 2000 Oct; 72 (4): 976-981.
  92. M.Giovannini , C.Agostoni , G.Biasucci , A.Rottoli , D.Luotti , S.Trojani , et al. "Fatty acid metabolism in phenylketonuria". Eur J Pediatr Suppl 1996 ; 155 (Suppl 1): S132-135
  93. C.Agostoni , N.Massetto , G.Biasucci, I.Basile , M.Giovannini , E.Riva " Visual effects of long-chain polynsaturated fatty acids in hyperphenylalaninemic children". Pediatr Res 1999; 45: 911.

94. R.Koch , W.Hanley , H.Levy et al “The Maternal Phenylketonuria Collaborative Study: 1984-2002” *Pediatrics* 2003; 112(6 Pt 2): 1523-1529
95. P.J.Lee, D.Ridout, J.H.Walter et al “Maternal Phenylketonuria: report from the United Kingdom Registry 1978-97” *Arch Dis Child* 2005; 90: 143-146
96. Medical Research Council Working Party on Phenylketonuria “Phenylketonuria due to phenylalanine hydroxylase deficiency: an unfolding story” *BMJ* 1993; 306: 115-119
97. S.L. Woo, A.S.Lidsky, F. guttler, T. Chandra, K.J.Robson “Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria” *Nature* 306 (1983)151-155
98. L.Hoang, S.Byck, L.Prevost, C.R. Scriver ” PAH mutation analysis consortium database - a database for disease-producing and other allelic variation at the human PAH locus” *Nucleic Acid Res*, 24 (1996) 127-131
99. Y.Okano, R.C. Eisensmith, F.Guttler, U. Lichter-Konecki, D.S. Konecki, F.. Trefz, M.Dasovich, T.Wang, K. hentiksen, H.Lou, et al “Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria” *N Engl J med* 324 (1991) 1232-1238
100. S.Kaufman “Phenylketonuria: biochemical mechanism”, in B.W.Agranoff, M.H. Aprison (Eds), *Advances in Neurochemistry*, Plenum Press, new York, 1976, pp.1-132
101. N.Blau, H. Erlandsen “The metabolic and molecular bases of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency” *mol Genet Metab* 2004, 82: 101-11
102. A.L. Pey, A. Martinez “The activity of wild type and mutant phenylalanine hydroxylase and its regulation by phenylalanine and tetrahydrobiopterin at physiological and pathological concentrations: an isothermal titration calorimetry study” *Mol Genet Metab* 2005; 86 (suppl 1):43-53

103. S.W. Gersting, K.F.Kemter, M. Staudigl, et al. "Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability" *Am J Hum Genet* 2008; 83:5-17
104. S.F. Dobrowolski, C.Heintz, T.Miller, C.R. Ellingson, C.C. Ellingson, I.Ozer, G. Gokcay, Y. Baykal, B.Thony, M.Demirkol, N.Blau "Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine Hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin responsiveness in Turkish PKU population" *Mol genet Metab* 10 (2011) 116-121
105. N.Blau, J.B.Hennermann, U.Langenbeck, U.Lichter Konecki "Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies" *Mol Genet Metab* 104 (2011) S2-S9
106. N.Blau, F.J. Van Spronsen, H.Levy "Phenylketonuria" *Seminar, Lancet* 2010,2010:1417-27
107. J.Leandro, C.Nascimento, I.Tavares de Almeida, P.Leandro "Co-expression of differet subunit of human phenylalanine hydroxylase: evidence of negative interallelic complementation" *Bioch Biophys Acta* 1762 (2006)544-550
108. P.Guldberg, V. Romano, N. Ceratto, P.Bosco, M.Ciuna, A.Indelicato, F.Mollica, C.Meli, M.Giovannini, E.Riva, et al. "Mutational spectrum of phenylalanine hydroxylase deficiency in Sicily: implications for diagnosis of hyperphenylalaninemia in Southern Europe" *Hum Mol Genet* 2(1993) 1703-1707
109. B.Perez, L.R.Desviat, M.de Lucca, M.Ugarte "Spectrum and origin of phenylketonuria mutations in Spain" *Acta Paediatr Scand Suppl.*407 (1994) 34-36
110. I.Dianziani, S.Giattanasio, L.de Sanctis, A.Alliaudi, P.Lattanzio, C.D. Vici, A. Burlina, M.Burroni, G.Sebastio, F.Carnevale, et al. "Characterization of phenylketonuria alleles in the italian population" *Eur.J.Hum Genet* 3 (1995) 294-302

111. S.F. Dobrowolsky, K.Borski, C.E.Ellingson, R.Koch, H.L.Levy, E.W.Naylor “ A limited spectrum of phenylalanine hydroxylase mutations is observed in phenylketonuria patients in western Poland and implications for treatment with 6R tetrahydrobiopterin” J. Hum. Genet. 54 (2009) 335-339